

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 9/10, 15/62, 15/63, 15/82, C12P 33/00, C12Q 1/68, C07K 16/40, A01H 5/00 // (C12N 15/63, C12R 1:19)</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/17789</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 30. April 1998 (30.04.98)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE97/02335 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 10. Oktober 1997 (10.10.97) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 196 43 309.6      21. Oktober 1996 (21.10.96)      DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> GVS GESELLSCHAFT FÜR ERWERB UND VERWERTUNG LANDWIRTSCHAFTLICHER PFLANZENSORTEN MBH [DE/DE]; Kaufmannstrasse 71, D-53115 Bonn (DE). <b>(71) Anmelder (nur für US):</b> BALTRUSCH, Rosa, Marie (Erbin des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]; Von-Ossietzky-Strasse 6, D-37085 Göttingen (DE). BALTRUSCH, Andreas (Erbe des verstorbenen Erfinders) [DE/DE]; Von-Ossietzky-Strasse 6, D-37085 Göttingen (DE). <b>(72) Erfinder:</b> BALTRUSCH, Martina (verstorben). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> HEINZ, Ernst [DE/DE]; Ohnhorststrasse 18, D-22609 Hamburg (DE). WARNECKE, Dirk [DE/DE]; Ohnhorststrasse 18, D-22609	<b>Hamburg (DE).</b> WOLTER, Frank, P. [DE/DE]; Ohnhorststrasse 18, D-22609 Hamburg (DE). <b>(74) Anwalt:</b> BAUER, Wulf; Bayenthalgürtel 15, D-50968 Köln (DE). <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, CA, CN, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(54) Title:</b> STEROL GLYCOSYL TRANSFERASES <b>(54) Bezeichnung:</b> STEROL-GLYCOSYLTRANSFERASEN <b>(57) Abstract</b> The invention relates to isolated DNA fragments or recombinant DNA constructs containing at least part of a sterol glycosyl transferase coding sequence. Substances used as sterols are either sterols in the strictest sense (cholesterol, ergosterol, beta-sitosterol, stigmasterol) or made from a skeletal structure of 5-alpha-cholesteran-3-beta-ol or 5-alpha-cholestan-3-alphol-ol (possibly modified by side-chains or double bonds in the ring systems). The invention also relates to DNA sequences, the use thereof to modify the content and/or structure of steryl glycosides and/or synthetic secondary products in transgenic organisms. <b>(57) Zusammenfassung</b> Die Erfindung betrifft isolierte DNA-Fragmente oder rekombinante DNA-Konstrukte, die mindestens einen Teil einer Sterol-Glycosyltransferase kodierenden Sequenz enthalten. Als Sterole werden hier Substanzen, die entweder Sterole im engeren Sinn (Cholesterol, Ergosterol, beta-Sitosterol, Stigmasterol) sind, oder die aus einem 5-alpha-cholestan-3-beta-ol oder 5-alpha-cholestan-3-alpha-ol Grundgerüst (evt. durch Seitenketten oder Doppelbindungen in den Ringsystemen modifiziert) bestehen. Betroffen sind DNA-Sequenzen, sowie deren Verwendungen zur Veränderung des Gehaltes und/oder der Struktur von Sterylglycosiden und/oder synthetischen Folgeprodukten in transgenen Organismen.		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Bezeichnung: Sterol-Glycosyltransferasen

Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für Sterol-Glycosyltransferasen kodieren, sowie deren Verwendung zur Veränderung des Gehalts und/oder der Struktur von Sterylglycosiden und/oder deren synthetischen Folgeprodukte in transgenen Organismen.

Sterylglycoside und die biosynthetischen Folgeprodukte Steryloligoglycoside und acylierte Sterylglycoside sind in Pflanzen sowie in einigen Pilzen und Bakterien vorkommende Naturstoffe. Für diese Stoffe und deren Folgeprodukte sind viele physiologische Effekte beschrieben wie z.B. Hemmung der vasculären Permeabilität, Anti-Tumor-Aktivität, entzündungshemmende und haemostatische Wirkung (Okuyama, E. und Yamazaki, M. (1983) Yakugaku Zasshi 103: 43 ff; Normura, T.; Watanabe, M.; Inoue, K. und Ohata, K. (1978) Japan J. Pharmacol. 28, Suppl. 110P; Miles, D. H.; Stagg, D. D. und Parish, E.J. (1979) J. Nat. Prod. 42: 700 ff; King, M. L.; Ling, H. C.; Wang, C.T. und Su, M. (1979) J. Nat. Prod. 42: 701 ff.; Seki, J.; Okita, A.; Watanabe, M.; Nakagawa, T.; Honda, K.; Tatewaki, N. und Sugiyama, M. (1985) J. Pharm. Sci. 74: 1259-1264), die eine Anwendung als therapeutisch wirksame Substanzen beim Menschen nahelegen. Als Medikament erhältlich ist bislang nur aus Pflanzen isoliertes  $\beta$ -Sitosterin- $\beta$ -D-Glucosid zur Behandlung der Prostatahyperplasie (z.B. als Harzol-Kapseln, Hoyer GmbH, Neuß).

Ein Nachteil dieser Substanzen ist dabei, daß sie in den Organismen nur in relativ geringen Mengen vorliegen und durch aufwendige Verfahren extrahiert und gereinigt werden müssen. Außerdem sind einige Organismen, die diese Substanzen enthalten humanpathogen und lassen sich nur mit großem Aufwand kultivieren, was ihre potentielle Verwendung als Medikament, Detergentien, Emulgatoren, als Grundstoff für Kunststoffe und für die Herstellung von Liposomen, wenn sie in größeren Mengen und höherer Reinheit vorliegen müssen, momentan wenig brauchbar erscheinen läßt.

Die enzymatische Synthese der Sterylglycoside in den Organismen aus Zuckernukleotiden und Sterolen mit freier OH-Gruppe wird durch die zucker-nukleotidabhängigen Sterol-Glycosyltransferasen (kurz: Sterol-Glycosyl-

- 2 -

transferasen) katalysiert. Diese Enzyme können zum Teil aus den Organismen isoliert und gereinigt werden, stehen aber für wirtschaftliche Anwendungen nicht in ausreichenden Mengen und Qualitäten zur Verfügung.

Die Aktivität dieser Enzyme kann mit speziellen in vitro-Enzymnachweissystemen nachgewiesen werden. In einem Fall konnte darüberhinaus eine Sterol-Glucosyltransferase aus Hafer bis zur Homogenität gereinigt werden (Warnecke und Heinz, 1994). Es ist jedoch noch kein Gen oder eine andere Nukleinsäure bekannt, die für eine Sterol-Glycosyltransferase kodiert.

Weiterhin ist eine Reihe von Nukleinsäuresequenzen bekannt, die Ähnlichkeit zu den in dieser Anmeldung beschriebenen Sequenzen besitzen. In keinem Fall wurde für diese aber eine Sterol-Glycosyltransferase-Aktivität des zugehörigen Transkriptionsprodukts gezeigt oder auch nur diskutiert. Solche Nukleinsäuresequenzen können nun dazu verwendet werden, den Gehalt und/oder die Zusammensetzung an Sterylglycosiden und Folgeprodukten in bestimmten Organismen zu manipulieren und damit ökonomisch relevante Eigenschaften dieser Organismen positiv zu verändern. So können Kulturpflanzen mit verbesserter Toleranz oder Resistenz gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen wie Bodenversalzung, Trockenheit, Kälte und Frost erzeugt werden. Auch Mikroorganismen wie z.B. Bäcker- und Brauhefe kann hinsichtlich Ethanol und Temperaturtoleranz verbessert werden.

Neben dem Reaktionsprodukt Sterylglycosid kann aber auch das Enzym selbst wirtschaftlich nutzbar sein, wenn man es rein und in großer Menge gentechnisch herstellt. Als Beispiel sei hier die Anwendung zur Cholesterol-Quantifizierung genannt.

Weiterhin können die Sterol-Glycosyltransferasen - und die hierfür kodierenden DNA-Sequenzen - aufgrund der Ähnlichkeit von Solanidin mit Sterolen - auch als Enzyme, bzw. für die Bereitstellung solcher Enzyme, verwendet werden, die für die Synthese von Solanin in Solanaceen verantwortlich sind. Hiermit ließen sich dann gentechnisch veränderte solaninarme oder -freie Pflanzen herstellen. Durch Wahl geeigneter Methoden kann eine solche Reduzierung auf bestimmte Pflanzenteile oder Entwicklungsstadien begrenzt werden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Nukleinsäurefragmente zur Ver-

- 3 -

fügung zu stellen, mit denen sich transgene Organismen herstellen lassen, die verbesserte ökonomisch relevante Eigenschaften haben oder mit denen in vivo oder in vitro Sterylglycoside und deren Folgeprodukte erzeugt werden können. Diese Substanzen können

- a) in größeren Mengen erzeugt werden als in den Ausgangsorganismen; oder
- b) von Organismen erzeugt werden, die leichter und sicherer zu kultivieren sind als jene, in denen diese Stoffe natürlicherweise vorkommen; oder
- c) von neuartiger Struktur sein und für die Anwendung günstigere Eigenschaften aufweisen.

Es wurde ein Verfahren gefunden, die Synthese von Sterylglycosiden und deren Folgeprodukten zu kontrollieren. Dazu werden Nukleinsäurefragmente bereitgestellt, die für Sterol-Glycosyltransferasen kodieren, um chimäre Gene zu erzeugen. Diese chimären Gene können benutzt werden, um Zellkulturen, Pflanzen, Tiere oder Mikroorganismen zu transformieren und damit deren Sterylglycosidsynthese zu verändern.

Die Erfindung betrifft

- (1) ein isoliertes DNA-Fragment oder rekombinantes DNA-Konstrukt enthaltend mindestens einen Teil einer Sterol-Glycosyltransferase oder Sterol-Glycosyltransferase im engeren Sinn kodierenden Sequenz;
- (2) ein Protein das aus einer der in Fig. 1-3 oder 11-22 gezeigten Nukleinsäuresequenzen abgeleitet ist;
- (3) Plasmide, Viren oder andere Vektoren, die Nukleinsäuren wie in (1) definiert, enthalten;
- (4) Genomische Klone die Gene oder Teile von Genen enthalten, die für eine Sequenz wie in (1) definiert, kodieren;
- (5) ein Chimäres Gen, das in der Lage ist, in einer transformierten Zelle den Gehalt an Sterol-Glycosyltransferase oder Sterol-Glycosyltransferase im engeren Sinn, insbesondere Sterol-Glucosyltransferase oder Sterol-Glucosyltransferase im engeren Sinn, zu verändern;
- (6) transformierte Zellen, transformierte Mikroorganismen, Pflanzen oder Pflanzenteile, die ein chimäres Gen wie in (5) definiert, enthalten;
- (7) ein Verfahren zum Herstellen von Sterylglycosiden umfassend das Kultivieren der in (6) definierten transformierten Organismen;
- (8) die durch das in (7) definierte Verfahren erhältlichen Sterylglycoside oder deren Folgeprodukte;

- 4 -

(9) ein DNA-Fragment, erhältlich nach einem der folgenden Verfahren oder Teilen davon:

a) Verwenden von einer der in Fig. 1-3 oder 11-13 oder 17 gezeigten Nukleinsäuresequenzen als Hybridisierungsprobe;

b) Verwenden der in Fig. 4, 5, 14-16, 18, 19, 21 oder 22 gezeigten Aminosäuresequenzen zur Synthese von Peptiden oder Proteinen, die zur Gewinnung von Antisera dienen; oder

c)i) Vergleichen der in Fig. 1-3, 11-13 oder 17 gezeigten Nukleotidsequenzen oder der daraus abgeleiteten, in Fig. 4, 5, 14-16, 18, 19, 21 oder 22 gezeigten Aminosäuresequenzen untereinander oder mit bereits bekannten Nukleotidsequenzen oder daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen,

ii) Ableiten und Synthetisieren von geeigneten spezifischen Oligonukleotiden aus ähnlichen Bereichen dieser Sequenzen, und

iii) Benutzen dieser Oligonukleotide, um mit Hilfe eines sequenzabhängigen Protokolls, insbesondere der PCR-Methode, Nukleinsäuren herzustellen, die für Sterol-Glycosyltransferasen oder Sterol-Glycosyltransferasen im engeren Sinn, insbesondere Sterol-Glucosyltransferasen oder Sterol-Glucosyltransferasen im engeren Sinn oder Teilen davon kodieren;

(10) ein chimäres Gen das ein in (9) definiertes DNA-Fragment enthält und das in der Lage ist, in einer transformierten Zelle den Gehalt an Sterol-Glycosyltransferase oder Sterol-Glycosyltransferase im engeren Sinn, insbesondere Sterol-Glucosyltransferase oder Sterol-Glucosyltransferase im engeren Sinn, zu verändern;

(11) transformierte Zellen, die ein chimäres Gen, wie in (10) definiert, enthalten;

(12) Organismen, insbesondere Mikroorganismen wie Bakterien und Hefen, deren Gen oder Gene, die für Sterol-Glycosyltransferasen oder Sterol-Glycosyltransferasen im engeren Sinn, insbesondere Sterol-Glucosyltransferasen oder Sterol-Glucosyltransferasen im engeren Sinn, kodieren, durch Transformation mit geeigneten chimären Genen deletiert oder unterbrochen sind;

(13) Sterol-Glycosyltransferasen oder Sterol-Glycosyltransferasen im engeren Sinn, insbesondere Sterol-Glucosyltransferasen oder Sterol-Glucosyltransferasen im engeren Sinn, oder Teile davon oder Fusionsproteine mit den genannten Transferasen, die aus Organismen wie in (6) oder (11) definiert, erhältlich sind; und

(14) Antisera, Produkte aus Antisera, Antikörper oder Teile davon, die gegen Proteine wie in (13) definiert, gerichtet sind.

Die Nukleinsäurefragmente, die für Sterol-Glucosyltransferasen kodieren (Fig. 2, 17) konnten aus *Avena sativa* und *Arabidopsis thaliana* isoliert werden. Die von diesen Nukleinsäurefragmenten abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen überraschend geringe Ähnlichkeiten zu den bekannten Sequenzen von Steroidhormon-Glucuronosyltransferasen. Es ist daher überraschend, daß wir mit unseren Methoden völlig neue Nukleinsäurefragmente isolieren konnten. Es sind bislang keine anderen Nukleinsäurefragmente identifiziert worden, die für Sterol-Glycosyltransferasen kodieren. Die isolierten eukaryoten Nukleinsäurefragmente sind dadurch charakterisiert, daß sie überraschenderweise dazu geeignet sind, mit entsprechenden Steuersequenzen versehen, sowohl in eukaryoten als auch in prokaryoten Organismen, und hierin also ohne die typisch eukaryote Prozessierung und Modifizierung, die Synthese von enzymatisch aktiven Sterol-Glucosyltransferasen zu bewirken.

Die Erfindung betrifft auch isolierte Nukleinsäurefragmente, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen definierte Ähnlichkeiten zu den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der in Fig. 12 oder 13 gezeigten Sequenzen haben. Die Erfindung betrifft ebenfalls alle Plasmide, Viren und andere Vektoren, die diese isolierten Nukleinsäurefragmente oder Teile davon enthalten.

Die in Fig. 4 und 18 dargestellten Aminosäuresequenzen zeigen auffällige Ähnlichkeiten mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz eines genomischen DNA-Stück aus *S. cerevisiae* (siehe Fig. 9) Dabei handelt es sich um das Chromosom XII Cosmid 9470 (Genbank Nr. gb U17246). Die Ähnlichkeit bezog sich auf den 3'-Bereich, des in reverser Richtung offenen Leserahmens von bp 32961-36557 (Gen L9470.23). Für dieses putative Gen ist bislang keine Funktion bekannt. Es werden verschiedene Teile dieses Gens mit geeigneten Steuersequenzen versehen und konnten nach Transformation von *E. coli* mit diesem chimären Gen überraschenderweise Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität in Zellhomogenaten der transgenen Zellen nachweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der Nukleinsäuresequenzen von Fig. 1-3, 11-13 und 17, oder den daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen zur Isolierung von Genen oder cDNAs, die für andere Sterol-Glycosyltransferasen kodieren. Dies betrifft z.B. die Verwendung der Sequenzen oder Teilen davon als Hybridisierungsproben, Verwendung von Antikörpern

gegen ein Polypeptid, das von den Nukleinsäurefragmenten bzw. Derivaten davon kodiert wird. Außerdem ist die Ableitung von Oligonukleotiden und deren Verwendung in der PCR-Methode, aus den Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen auch durch Vergleich mit anderen Sequenzen betroffen.

Die Erfindung betrifft alle Plasmide, Viren, und andere Vektoren, die die Nukleinsäurefragmente aus den Fig. 1-3, 11-13, 17 oder Teile davon oder das Hefegen L9470.23 oder Teile davon oder Nukleinsäurefragmente oder Teile davon, die nach den im letzten Absatz beschriebenen Methoden isoliert wurden, enthalten und die zur Expression von Sterol-Glycosyltransferasen in transformierten Zellen geeignet sind. Schutzanspruch wird auch erhoben auf alle Organismen (Mikroorganismen, Tiere, Pflanzen, Teile davon, Zellkulturen), die diese chimären Gene enthalten und den Produkten oder Extrakten daraus, wenn die stoffliche Zusammensetzung dieser Organismen durch die Wirkung dieser chimären Gene verändert wurde.

Die Darstellung von Nukleinsäuren in den Abbildungen ist stets vom 5'-Ende zum 3'-Ende, die von Proteinen vom Aminoterminal zum Carboxyterminal. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code benannt. Die Abbildungen dienen zur Erläuterung der vorliegenden Erfindung. Sie zeigen:

Fig. 1: DNA-Teilsequenzen eines ca. 800 bp langen DNA-Fragments, das mit der PCR-Methode aus Hafer cDNA gewonnen wurde (siehe Beispiel 3.). A. 5'-terminale Sequenz wal8e. B. 3'-terminale Sequenz wal9er.

Fig. 2: DNA-Sequenz des Nukleinsäurefragments HaSGT, das aus einer cDNA-Expressionsbibliothek aus Haferkeimlingen isoliert wurde. Sie hat eine Länge von 2317 Basenpaaren (bp) und enthält ein offenes Leseraster von Position 1 bis 1971. Start- bzw. Stopcodon finden sich bei den Positionen 148-150 bzw. 1972-1974.

Fig. 3: Vergleiche der DNA-Teilsequenzen wal8e und wal9er des 800 bp langen DNA-Fragments (Fig. 1) mit der Sequenz des Haferklons HaSGT (Fig. 2). Der Vergleich wurde mit Hilfe des Programms CLUSTAL (Higgins und Sharp, 1988, Gene 73, 237-244) durchgeführt. A. Vergleich zwischen wal8e und HaSGT. B. Vergleich zwischen wal9er und HaSGT. Die \* markieren identische Basen.

Fig. 4: Aminosäuresequenz HaSGTP im Ein-Buchstaben-Code, die aus der



- 7 -

DNA-Sequenz des Nukleinsäurefragments HaSGT abgeleitet wurde und die für eine Sterol-Glucosyltransferase mit einer molekularen Masse von 71 kD kodiert.

Fig. 5: Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenz des gereinigten Enzyms (N-TERMINUS) mit der aus dem Haferklon HaSGT abgeleiteten Aminosäuresequenz HaSGTP. Der Vergleich wurde mit Hilfe des Programs CLUSTAL (Higgins und Sharp, 1988, Gene 73, 237-244) durchgeführt. Die \* markieren identische Aminosäuren. - bezeichnen nicht vorhandene oder unbekannte Aminosäuren.

Fig. 6: Dünnschichtchromatographische Analyse radioaktiver Produkte von in vitro Enzymassays, die mit zellfreien Homogenaten aus transformierten E. coli-Zellen durchgeführt wurden (Beispiel 5.).

Die organischen Phasen wurden auf Kieselgel 60 Platten (Merck, Darmstadt) aufgetragen, die mit dem Laufmittel Chloroform:Methanol 85:15 (A) bzw. Chloroform:Methanol:Ammoniak (25%ig) 65:35:5 (B) entwickelt wurden. Die R<sub>f</sub>-Werte der radioaktiven, lipophilen Reaktionsprodukte wurden mit einem Berthold-TLC-Analyser bestimmt und mit authentischen Standards verglichen, die mit  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure detektiert wurden. Es konnte jeweils nur ein Produkt nachgewiesen werden, das als Sterylglucosid identifiziert wurde. Der R<sub>f</sub>-Wert des Sterylglucosids weicht bei A in diesem Fall von dem mit diesem Laufmittel üblichen Wert ab, weil das Laufmittel nicht frisch angesetzt wurde und eine Veränderung der Zusammensetzung durch Verdunstung stattgefunden hatte. A. Die E. coli Zellen wurden mit dem Plamid pBS-ATG (Beispiel 5.) transformiert. B. Die E. coli Zellen wurden mit dem Plamid pBS-HRP (Beispiel 5.) transformiert.

Fig. 7: Western-Blot von rekombinanten Sterol-Glucosyltransferasen.

Je 40  $\mu$ g Protein von E. coli Zellen, die verschiedene Teile des Haferklons HaSGT exprimieren wurde einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und anschließend auf eine hydrophobe Membran übertragen. Die Immunofärbung wurde mit einem Antiserum gegen die aus Hafer gereinigte Sterol-Glucosyltransferase durchgeführt. Spur 1 und 2: Protein von E. coli-Zellen, die mit dem Plamid pBS-HRP transformiert wurden. Spur 3: Protein von E. coli-Zellen, die mit dem Plamid pBS-HATG transformiert wurden. Spur 4: Standardproteine mit den Molekularmassen von 31, 45, 66 und 97 kD. Die Proteine wurden mit Ponceaurot gefärbt, die Standardproteine mit

einem Stift markiert und wieder entfärbt.

Fig. 8: Dünnschichtchromatographische Analyse radioaktiver Produkte eines *in vitro* Enzymassays, der mit zellfreiem Homogenat aus mit dem Plasmid pGALHAM1 transformierten *S. cerevisiae*-Zellen durchgeführt wurde (Beispiel 6.). Die organische Phase wurde auf eine Kieselgel 60 Platte (Merck, Darmstadt) aufgetragen, die mit dem Laufmittel Chloroform:Methanol 85:15 entwickelt wurde. Der Rf-Wert des radioaktiven, lipophilen Reaktionsprodukts wurde mit einem Berthold-TLC-Analyser bestimmt und mit authentischen Standards verglichen, die mit  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure detektiert wurden. Es konnte nur ein Produkt nachgewiesen werden, das als Sterylglucosid identifiziert wurde.

Fig. 9: Aus der DNA-Sequenz des *S. cerevisiae*-Gens L9470.23 abgeleitete Aminosäuresequenz im Ein-Buchstaben-Code. Die Aminosäuren mit denen der zweite Abschnitt der Fusionsproteine beginnt, für die die Plasmide der Klonierungen 1 bis 4 kodieren (Beispiel 7.), sind markiert.

Fig. 10: Dünnschichtchromatographische Analyse radioaktiver Produkte von *in vitro* Enzymassays, die mit zellfreien Homogenaten aus transformierten *S. cerevisiae*-Zellen durchgeführt wurden (siehe Beispiel 7.).

Die organischen Phasen wurden auf Kieselgel 60 Platten (Merck, Darmstadt) aufgetragen, die mit dem Laufmittel Chloroform:Methanol 85:15 entwickelt wurden. Die Rf-Werte der radioaktiven, lipophilen Reaktionsprodukte wurden mit einem Berthold-TLC-Analyser bestimmt und mit authentischen Standards verglichen, die mit  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure detektiert wurden. Es konnte jeweils nur ein Produkt nachgewiesen werden, das als Sterylglucosid identifiziert wurde. A. Die *S. cerevisiae*-Zellen wurden mit dem Plasmid der Klonierung 2 transformiert. B. Die *S. cerevisiae*-Zellen wurden mit dem Plasmid der Klonierung 4 (Beispiel 5.) transformiert.

Fig. 11: DNA-Sequenz des DNA-Fragments Apcr, das mit der PCR-Methode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert wurde (Beispiel 8.).

Fig. 12: DNA-Sequenz des DNA-Fragments Kpcr, das mit der PCR-Methode aus *Solanum tuberosum* wurde (Beispiel 8.).

Fig. 13: DNA-Teilsequenz des DNA-Fragments Cpcr, das mit der PCR-Methode

aus *Candida albicans* isoliert wurde (Beispiel 8.).

Fig. 14: A. Aminosäuresequenz ApcrP im Ein-Buchstaben-Code, die aus der DNA-Sequenz des DNA-Fragments Apcr abgeleitet wurde. B. Vergleich der Aminosäuresequenz ApcrP mit der Hafersequenz HaSGTP. Der Vergleich wurde mit Hilfe des Programs CLUSTAL (Higgins und Sharp, 1988, Gene 73, 237-244) durchgeführt. Die \* markieren identische Aminosäuren.

Fig. 15: A. Aminosäuresequenz KpcrP im Ein-Buchstaben-Code, die aus der DNA-Sequenz des DNA-Fragments Kpcr abgeleitet wurde. B. Vergleich der Aminosäuresequenz KpcrP mit der Hafersequenz HaSGTP. Der Vergleich wurde mit Hilfe des Programs CLUSTAL (Higgins und Sharp, 1988, Gene 73, 237-244) durchgeführt. Die \* markieren identische Aminosäuren.

Fig. 16: A. Aminosäuresequenz CpcrP im Ein-Buchstaben-Code, die aus der DNA-Teilsequenz des DNA-Fragments Cpcr abgeleitet wurde. B. Vergleich der Aminosäuresequenz CpcrP mit der Hafersequenz HaSGTP. Der Vergleich wurde mit Hilfe des Programs CLUSTAL (Higgins und Sharp, 1988, Gene 73, 237-244) durchgeführt. Die \* markieren identische Aminosäuren.

Fig. 17: DNA-Sequenz des Nukleinsäurefragments AtSGT, das aus einer cDNA-Expressionsbibliothek aus Haferkeimlingen isoliert wurde (Beispiel 9.). Sie hat eine Länge von 2353 Basenpaaren (bp) und enthält ein offenes Leseraster von Position 1 bis 2023. Start- bzw. Stopcodon finden sich bei den Positionen 113-115 bzw. 2023-2025.

Fig. 18: Aminosäuresequenz AtSGTP im Ein-Buchstaben-Code, die aus der DNA-Sequenz des Nukleinsäurefragments AtSGT abgeleitet wurde.

Fig. 19: Vergleich der Aminosäuresequenzen HaSGTP und AtSGTP. Der Vergleich wurde mit Hilfe des Programs CLUSTAL (Higgins und Sharp, 1988, Gene 73, 237-244) durchgeführt. Die \* markieren identische Aminosäuren.

Fig. 20: Dünnschichtchromatographische Analyse radioaktiver Produkte eines *in vitro* Enzymassays, der mit zellfreiem Homogenat aus mit dem Plasmid pBS-AtSGT transformierten *E. coli*-Zellen durchgeführt wurde (Beispiel 10.). Die organische Phase wurde auf Kieselgel 60 Platten (Merck, Darmstadt) aufgetragen, die mit dem Laufmittel Chloroform:Methanol 85:15 ent-

wickelt wurde. Der Rf-Wert des radioaktiven, lipophilen Reaktionsprodukts wurde mit einem Berthold-TLC-Analyser bestimmt und mit authentischen Standards verglichen, die mit  $\alpha$ -Naphthol-Schwefelsäure detektiert wurden. Es konnte nur ein Produkt nachgewiesen werden, das als Sterylglucosid identifiziert wurde.

Fig. 21: Partielle Aminosäuresequenz der Sequenz HaSGTP im Ein-Buchstaben-Code.

Fig. 22: Partielle Aminosäuresequenz der Sequenz AtSGTP im Ein-Buchstaben-Code.

Fig. 23: Partielle Aminosäuresequenz im Ein-Buchstaben-Code, die aus dem *S. cerevisiae*-Gen L9470.23 abgeleitet wurde.

Die Erfindung wird im folgenden an Beispielen erläutert:

1. Reinigung der UDP-Glucose: Sterol-Glucosyltransferase, Antiserum, N-terminale Sequenzierung:

Die Reinigung des Enzyms, die Produktion eines Antiserums gegen das Protein und die Western-Blot Analysen wurde nach bekannten Methoden Warncke, D. C. und Heinz, E. (1994) Plant Physiol. 105: 1067-1073 durchgeführt. Anschließend wurde eine Analyse von Teilsequenzen der Aminosäuresequenz des Proteins vorgenommen. Das bis zur Homogenität gereinigte Protein wurde einer SDS-PAGE unterworfen und elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (Immobilon P, Millipore, Eschborn) übertragen. Das Protein wurde mit Coomassie Brilliant Blue R 250 (Biorad, München) gefärbt und die einer molekularen Masse von 56 kD entsprechende Bande aus der Membran ausgeschnitten. Das Protein wurde anschließend direkt N-terminal sequenziert oder proteolytisch geschnitten, um interne Bruchstücke zu erhalten. Das Protein wurde nach Bauw, G.; van den Bulcke, M.; van Damme, J.; Puype, M.; van Montagu, M. und Vandekerckhove, J. (1988) J. Prot. Chem. 7: 194-196 mit Trypsin verdaut und die proteolytischen Bruchstücke mit einer High-Performance-Liquid-Chromatography-Anlage (130A, Applied Biosystems, Weiterstadt) auf einer 'reverse phase' Säule getrennt (Vydac C4, 300 Angström Porendurchmesser, 5  $\mu$ m Partikelgröße). Die Peptide

- 11 -

wurden mit einem linearen Gradienten (0-80% B, Lösung A: Wasser mit 0,1 % Trifluoressigsäure, Lösung B: 70 Acetonitril mit 0,09 % Trifluoressigsäure) mit einer Flußrate von 0,2 ml/min eluiert. Das Elutionsmuster der Peptide entsprach dem Muster, das typischerweise einem Trypsin-selbstverdau entspricht. Auch nach mehrfacher Wiederholung des Versuchs konnte kein Peptid aufgrund der Retentionszeit dem gereinigten Protein zugeordnet werden. Daraufhin wurden die meisten Peptide sequenziert. Die Sequenzen entsprachen jedoch alle der Aminosäuresequenz des Trypsins. Diese Versuche zeigten, das das gereinigte sehr hydrophobe Membranprotein dem Trypsinverdau gut widersteht und dass die hydrophoben Peptidbruchstücke sich offenbar kaum noch von der Membran lösen lassen. Die Versuche wurden jedoch mit einer alternativen Strategie fortgesetzt. Nach erneuten Verdauungsversuchen wurden die eluierten Peptide einer Rechromatographie unterworfen (mit einer Nucleosil C8-Säule, 120 X 1,6 mm, Gradient wie oben). Dabei stellte sich überraschenderweise heraus, das ein scheinbar homogenes Peptid des Trypsin-selbstverdaus eine Nebenkomponente enthielt, dessen Aminosäuresequenz nicht der von Trypsin entsprach. Diese Sequenz lautet im Ein-Buchstaben-Code: MTETTHQALEMTGQ. Die Proteinsequenzierungen wurden nach der Standard-Edman-Degradation auf einem automatischen Sequenziergerät (473A, Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

Es wurden die N-terminale Aminosäuresequenz auf einer Länge von 15 Aminosäuren bestimmt. Diese lautet im Ein-Buchstaben-Code: DVGGEDGYGDVTVEE. - Zusätzlich wurde die Sequenz eines Peptidbruchstücks auf einer Länge von 14 Aminosäuren bestimmt. Diese lautet im Ein-Buchstaben-Code: MTETTHQALEMTGQ.

## 2. Erstellung einer Hafer cDNA-Bank:

Es wurde eine cDNA-Expressionsbibliothek aus Hafer angelegt, um vollständige Klone der Sterol-Glucosyltransferase zu isolieren.

Zuerst wurde RNA aus 4 Tage alten und im Dunkeln kultivierten Haferkeimlingen (*Avena sativa*, Sorte Alfred) isoliert. Dazu wurden die Keimlinge in flüssigem Stickstoff zermörsert. Das Pulver wurde in einen Puffer mit Guanidinisothiocyanat aufgenommen und filtriert. Die RNA wurde durch eine Caesiumchloridlösung in der Ultrazentrifuge sedimentiert. Das Sediment wurde in Aqua dest. aufgenommen und die RNA mit 2 Teilen Ethanol und 0,05 Teilen Essigsäure gefällt und sedimentiert. Das Sediment wurde in

- 12 -

Aqua dest. aufgenommen. Aus der Hafer RNA wurde mRNA isoliert. Dies wurde mit Dynabeads Oligo (dT) der Firma Dynal GmbH (Hamburg) nach der Gebrauchsanweisung durchgeführt. Mit Hilfe des ZAP-cDNA Synthesis Kit (Firma Stratagene, Heidelberg) wurde aus der isolierten mRNA nach Herstellerangaben cDNA synthetisiert und eine cDNA-Bank angelegt.

3. Isolation von partiellen DNA-Sequenzen der Sterol-Glucosyltransferase aus Hafer mit der PCR-Methode.

Aus den Sequenzen der N-terminalen Aminosäuresequenzierung (siehe 1.) wurden Oligonukleotidprimer abgeleitet:

DW1 = 5'-GGITAYGGIGAYGTNACIGTIGARGA-3' (Vorwärtsprimer)

DW2 = 5'-GAYGTIGGIGGIGARGAYGGNTA-3' (Vorwärtsprimer)

als Reverseprimer diente

XXS4T = 5'-GATCTAGACTCGAGGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

Abkürzungen: Y = C und T - D = G und A und T - I = Inosin - N = A und G und C und T - R = G und A - K = G und T - S = G und C - H = A und T und C - B = G und T und C - V = G und A und C - X = C und I - W = A und T - M = A und C

Die Polymerase-Kettenreaktion-(PCR)-Methode wurde wie folgt durchgeführt:

Reaktionsmix: 46 µl Aqua dest.; 5 µl Boehringer (Mannheim) 10x PCR-Puffer; je 1 µl 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTDP; je 1 µl 100 µM DW1 (bzw. DW2), XXS4T; 0,25 µl Boehringer Taq-Polymerase; 0,5 µl cDNA aus Haferkeimlingen (siehe 2., Konzentration nicht bestimmt).

Reaktionsbedingungen: 94 °C, 3 min; 30x (94 °C, 40 s; 53 °C, 1 min; 72 °C, 3 min); 72 °C, 10 min.

Diese PCR-Reaktionen mit einem spezifischen Primer (DW1 bzw. DW2) und einem unspezifischen Primer (XXS4T), der an alle Klone der cDNA-Bank bindet, die ein sogenanntes PolyA-Ende enthalten, blieben erfolglos. Das heisst, es konnte kein DNA-Fragment amplifiziert, kloniert und sequenziert werden, das Sequenzteile enthielt, die den eingesetzten Primern entsprachen.

- 13 -

Die PCR-Reaktion wurde in zahlreichen Modifikationen durchgeführt (anderes Temperaturprogramm, sogenannte Nested-PCR mit den Primern DW1 und DW2), blieb jedoch weiterhin erfolglos.

Daraufhin wurden Versuche zur Sequenzierung von Peptidbruchstücken des gereinigten Proteins unternommen (siehe 1), um PCR-Reaktionen mit zwei spezifischen Primern durchführen zu können.

Aus den Sequenzen der Peptid-Aminosäuresequenzierung (siehe 1.) wurde folgender Oligonukleotidprimer abgeleitet:

Wal = 5'-GCYTGDATDATIGTYTCIGTC-3' (Reverseprimer)

Die Polymerase-Kettenreaktion-(PCR)-Methode wurde wie folgt durchgeführt:

Reaktionsmix: 46 µl Aqua dest.; 5 µl Boehringer (Mannheim) 10x PCR-Puffer; je 1 µl 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTDP; je 1 µl 100 µM DW1, Wal; 0,25 µl Boehringer Taq-Polymerase; 0,5 µl cDNA aus Haferkeimlingen (siehe 2., Konzentration nicht bestimmt).

Reaktionsbedingungen: 94 °C, 3 min; 30x (94 °C, 40 s; 53 °C, 1 min; 72 °C, 3 min); 72 °C, 10 min.

Erst durch den Einsatz des spezifischen Reverseprimer Wal konnte eine erfolgreiche PCR-Reaktion durchgeführt werden: Eine Agarosegelelektrophorese mit 15 µl des Reaktionsansatzes ergab eine DNA-Bande von ca. 800 bp Länge.

Dieses DNA-Stück wurde mit dem SureClone Ligation Kit (Pharmacia, Freiburg) in einen Plasmidvektor kloniert und vom 5'- und 3' Ende teilsequenziert. Diese Sequenzen (wal8e und wal9er) werden in Fig. 1 gezeigt.

#### 4. Isolation vollständiger Klone

Das klonierte DNA-Stück (siehe 3.) wurde markiert und zum Absuchen einer cDNA-Bank (siehe 2.) verwendet, um vollständige Klone der Sterol-Glucosyltransferase zu isolieren.

Das DNA-Stück wurde mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Boehringer, Mannheim) nach Herstellerangaben nichtradioaktiv markiert, DIG = ein Di-

goxigenin-haltiges System zur Markierung von Nukleinsäuren von Boehringer (Mannheim). Anschließend wurde die markierte Probe zum Absuchen der Hafer cDNA-Bank verwendet. Die Methode ist im Boehringer DIG System User4s Guide for Filter Hybridization (Plaque Hybridization, Colorimetric Detection with NBT and BCIP) beschrieben. Es wurden 250.000 infektiösfähige Phagenpartikel abgesucht (Hybridisierungstemperatur 69 °C). Es wurden 50 positive Klone gefunden, von denen 13 einem zweiten und dritten Screening unterworfen wurden. Diese 13 positiven Klone wurden von der Phagenform in die Plasmidform überführt (in vivo excision nach Stratagene Protocol ZAP-cDNA-Synthesis Kit, Heidelberg).

Ein ca 2300 bp langer Klon (im folgenden HaSGT genannt) wurde vollständig und doppelsträngig sequenziert. Diese Sequenz ist in Fig. 2 gezeigt: Die Teilsequenzen (wal8e und wal9e) des klonierten PCR-Fragments sind zu über 95% identisch mit dem Klon HaSGT (Fig. 3). Dieser Klon ist 2317 bp lang, und zeigt einen offenen Leserahmen von bp 1 bis bp 1971. Ein Startcodon (ATG) für die Translation beginnt am bp 148. Wird der offene Leserahmen in eine Aminosäuresequenz übersetzt (HaSGTP, Fig. 4), so zeigt die Aminosäuresequenz vollständige Identitäten mit der Aminosäuresequenz des Peptidbruchstücks des gereinigten Proteins und fast vollständige Identitäten mit der N-terminalen Aminosäuresequenz des gereinigten Proteins (14 Aminosäuren von 15 sind identisch, Fig. 5). Diese Übereinstimmung zeigt klar, daß die klonierte cDNA dem gereinigten Protein entspricht. Der Unterschied bei einer Aminosäure beruht vermutlich auf allelischen Differenzen. Da die erste Aminosäure der N-terminalen Aminosäuresequenz des gereinigten Proteins (D) der Aminosäure 133 des offenen Leserahmens von Klon HaSGT entspricht, kann erwartet werden, daß der Klon für ein Präprotein kodiert, das in vivo zu einem reifen Protein geschnitten wird (putatives reifes Protein). Das Plasmid, das den 2317 bp langen Haferklon in dem Vektor pBluescript I SK enthält (zwischen der EcoRI- und der XhoI-Schnittstelle eingefügt), wird im folgenden pBS-HaSGT genannt.

##### 5. Funktionale Expression von Teilen des Klons HaSGT in E. coli.

Um zu beweisen, daß die klonierte DNA-Sequenz (siehe 4.) für eine Sterol-Glucosyltransferase kodiert, wurden Teile des Klons HaSGT funktional in E. coli exprimiert.

-Es wurden zwei Klonierungen in zur Expression geeignete Vektoren durchgeführt:



- 15 -

a) Diese Klonierung erzeugt ein Plasmid (pBS-HATG), das für ein Fusionsprotein kodiert, dessen erste Aminosäuren aus dem pBluescript lacZ-Operon und dem Polylinker stammen (normal gedruckt, siehe unten) und dessen folgende Aminosäuren denen nach dem Startmethionin, der in eine Aminosäuresequenz übersetzten Nukleotidsequenz des HaSGT, entsprechen (unterstrichen, siehe unten).

Das Plasmid pBS-HaSGT wurde mit den Restriktionsenzymen EaeI und EagI geschnitten und der linearisierte Teil, der die Vectorsequenzen enthält, mit sich selbst zusammenligiert. Das entstehende Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein, dessen Anfang wie folgt aussieht:

MTMITPSSSELTLTKGNKWSSTAVAAADADEPTGG...

b) Diese Klonierung erzeugt ein Plasmid (pBS-HRP), das für ein Fusionsprotein kodiert, dessen erste Aminosäuren aus dem pBluescript lacZ-Operon und dem Polylinker stammen (normal gedruckt, siehe unten) und dessen zweiter Teil dem putativen reifen Protein aus Hafer entspricht (unterstrichen, siehe unten).

Für diese Klonierung wird ein PCR-Versuch durchgeführt, bei dem DNA des Plasmids pBS-HaSGT als Matrix-DNA eingesetzt wurde. Es wurden folgende Primer verwendet:

DW 15 = GATGAGGAAATTCAGTAGTTG

DW 20 = GATGGATCCACTTGATGTTGGAGG

Ein PCR-Fragment von ca. 500 bp Länge wurde über ein Agarosegel gereinigt, mit den Restriktionsenzymen BamHI und NdeI geschnitten und nochmals über ein Gel gereinigt, aus dem ein Fragment von ca. 450 bp Länge isoliert wurde.

Das Plasmid pBS-HaSGT wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und NdeI geschnitten und ein Fragment von ca. 4300 bp Länge aus einem Agarosegel eluiert. Dieses Fragment wurde mit dem geschnittenen PCR-Fragment ligiert und zur Transformation von E. coli eingesetzt. Aus den transformierten Zellen wurde Plasmid-DNA isoliert und teilweise sequenziert. Die Plasmid-DNA kodiert für das folgende Fusionsprotein:

MTMITPSSSELTLTKGNKWSSTAVAAALVDLDVGGEDGY...

Bei den mit den Plasmiden pBS-HATG und pBS-HRP transformierten E. coli-Zellen wurde überprüft, ob das entsprechende Fusionsprotein exprimiert wurde, indem ein in vitro Enzymassay zum Nachweis von Sterol-Glucosyl-

transferase-Aktivität mit Zellhomogenaten durchgeführt wurde.

Die Zellen von 2 ml Übernachtskultur (2 ml LB-Ampicillin, 37 °C, 14 h) wurden sedimentiert und in 1 ml Lysispuffer aufgenommen (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 15 % Glycerol; 5 mM DTT; 1 mg/ml Lysozym (aus Hühnerei, Boehringer, Mannheim); 200 µM Pefabloc (Merck, Darmstadt); 0,1 % Triton X100. Nach 5minütiger Inkubation bei 20 °C wurden die Suspensionen auf Eis gestellt und die Zellen durch 3x 3 Sekunden Behandlung mit dem Ultraschallstab aufgebrochen.

Die Reaktionslösung des in vitro Enzymassays hatte ein Volumen von 60 µl und war wie folgt zusammengesetzt (17.1.1996):

100 mM Tris/HCl pH 8,0 (bei 30 °C); 1 mM DTT; 0,2 % Triton X100; 1 mM Cholesterol, 5 µl E. coli-Homogenat (1-2 mg Protein/ml), 100.000 dpm UDP-[U-<sup>14</sup>C]-Glucose (144 µM).

Die Reaktion wurde nach 20 min (bei 30 °C) durch Mischen mit 0,5 ml Wasser und 1,6 ml Ethylacetat gestoppt. Nach der Phasentrennung durch kurze Zentrifugation wurde die obere organische Phase entnommen und die darin enthaltene Radioaktivität mit einem Scintillationszähler bestimmt:

E. coli Homogenat mit pBS-HaATG: 620 desintegrations per minute (radioaktive Zerfälle pro Minute) (dpm)

E. coli Homogenat mit pBS-HRP: 3100 dpm

E. coli Homogenat, untransformiert: 0 dpm

Von länger inkubierten Parallelproben wurde die in der organischen Phase vorhandene Radioaktivität einer dünnenschichtchromatographischen Analyse unterzogen:

Die organischen Phasen wurden auf Kieselgel 60 Platten (Merck, Darmstadt) aufgetragen, die mit dem Laufmittel Chloroform:Methanol 85:15 entwickelt wurden. Die R<sub>f</sub>-Werte der radioaktiven, lipophilen Reaktionsprodukte wurden mit einem Berthold-TLC-Analyser bestimmt und mit authentischen Standards verglichen, die mit α-Naphthol-Schwefelsäure detektiert wurden. Es konnte jeweils nur ein Produkt nachgewiesen werden, das als Sterylglucosid identifiziert wurde (siehe Fig. 6). Damit konnte nachgewiesen werden, daß die transformierten E. coli Zellen ein Protein exprimieren, das Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität zeigt. Nichttransformierte Kontroll-Zellen zeigen keine Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität.

Die Expression der pflanzlichen Peptidsequenzen wurde außerdem durch

Western-Blot-Analysen nachgewiesen:

Je 40 µg Protein der *E. coli* Homogenate wurde mit 8 % Trichloressigsäure gefällt und anschließend einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (10%) unterworfen (mit Biorad Mini Protean II Apparat, München). Die Proteine wurden durch Elektroblothing auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und eine Immunofärbung durchgeführt (Anti-Sterol-Glucosyltransferase Antiserum 1:1000, Färbung mit Wasserstoffperoxid und 4-Chlor-naphthol). Die Western-Blot-Membran ist in Fig. 7 abgebildet. Bei *E. coli* mit pBS-HRP ist eine Bande von ca. 59 kD deutlich angefärbt. Bei *E. coli* mit pBS-HaATG ist eine 74 kD Bande die am intensivsten gefärbte. Bei diesen Proteinen handelt es sich um die auf den Plasmiden kodierten Proteine.

#### 6. Funktionale Expression eines Teils des Klons HaSGT in *S. cerevisiae*.

Dazu wurde ein Vektor hergestellt, der zur Expression der pflanzlichen cDNA in *Saccharomyces cerevisiae* geeignet ist.

- Amplifikation des CYC1 Terminators Zaret, J. K. und Sherman, F. (1982) Cell 28: 563-573 mit der PCR-Methode unter der Verwendung der Primer 5'-GATATCTAGAGGCCGCAAATTAAAGCCTTC-3'

und

5'-CCCGGGATCCGAGGGCCGCATCATGTAATT-3'

und Klonierung in den Vektor pRS316 Sikorski, R. S. und Hieter, P. (1989) Genetics 122: 19-27. Das resultierende Plasmid wurde pRS316t genannt.

-Klonierung des GAL1 Promotors (0,5 kb SpeI/XbaI Fragment) aus dem pYES Vektor (Invitrogen) in den Vektor Bluescript KS (Stratagen, Heidelberg). Aus der Klonierung resultierte pGAL1.

-Klonierung des GAL1 Promotors (0,5 kb XbaI/PvuII Fragment) aus pGAL1 in den Vektor Bluescript KS (HincII/XbaI). Das resultierende Plasmid wurde pGAL2 genannt.

-Klonierung des Fragments über XhoI/SacI in den pYES2.0 Vektor (Invitrogen, Leek, Holland). Daraus resultierte pGAL3.

-Klonierung des Fragments aus dem pGAL3 über KpnI/XhoI in den pRS316t.

Daraus entstand der single copy Hefeexpressionsvektor pGAL4 mit folgenden Eigenschaften:

single copy Plasmid, URA-Marker, GAL1 Promotor, CYC1 Terminator, MCS.

Ein Teil des Haferklons HaSGT wurde mit SalI/KpnI aus dem Plasmid pBS-

- 18 -

HaSGT ausgeschnitten und in den pSP72 Vector (Promega, Heidelberg, SallI/KpnI) kloniert. Das SallI/KpnI-Fragment des resultierenden Plasmids pSPHAM1 umfasst den entsprechenden Anteil des HaSGT und wurde in den Vektor pGAL4 (XhoI/BamHI) kloniert. Das resultierende Plasmid wurde pGALHAM1 und zur Transformation der *Saccharomyces cerevisiae* Stamm UTL-7A (MATa, ura3-52, trp1, leu2-3/112) eingesetzt.

Um die Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität der exprimierten pflanzlichen Sequenz nachzuweisen wurde ein in vitro Enzymassay mit zellfreiem Homogenat der Hefezellen durchgeführt. Die Hefezellen wurden auf folgendem Medium angezogen (72 h bei 29 °C aerob geschüttelt):

6,7 g/l Difco Yeast Nitrogen Base without Amino Acids; 10 mg/l Tryptophan; 60 mg/l Leucin; 1 % Galactose.

Die Zellen einer 30 ml Kultur werden sedimentiert und in 1 ml Lysis-Puffer aufgenommen:

50 mM Tris/HCl pH 7,5; 15 % Glycerol; 0,1 % Triton X100; 200 µM Pefabloc (Merck, Darmstadt); 1 mM DTT; 0,5 mg/ml Lyticase (Sigma, Deisenhofen). Nach einer Inkubation von 25 min bei 20 °C wurden die Zellen durch Ultraschallstab-Behandlung (3x 10 s) aufgebrochen.

Die Reaktionslösung des in vitro Enzymassays hatte ein Volumen von 150 µl und war wie folgt zusammengesetzt (10.3.1996):

100 mM Tris/HCl pH 8;0 (bei 30 °C); 1 mM DTT; 0,2 % Triton X100; 1 mM Cholesterol, 20 µl Hefe-Homogenat, 350.000 dpm UDP-[U-<sup>14</sup>C]-Glucose (4,2 µM).

Die Reaktion wurde nach 45 min (bei 30 °C) durch Mischen mit 0,5 ml Wasser und 1,6 ml Ethylacetat gestoppt. Nach der Phasentrennung durch kurze Zentrifugation wurde die obere organische Phase entnommen und die darin enthaltene Radioaktivität mit einem Scintillationszähler bestimmt:

Hefehomogenat mit pGAL4: 0 dpm

Hefehomogenat mit pGALHAM1: 13000 dpm

Von Parallelproben wurde die in der organischen Phase vorhandene Radioaktivität einer dünnschichtchromatographischen Analyse unterzogen:

Die organischen Phasen wurden auf Kieselgel 60 Platten (Merck, Darmstadt) aufgetragen, die mit dem Laufmittel Chloroform:Methanol 85:15 entwickelt wurden. Die R<sub>f</sub>-Werte der radioaktiven, lipophilen Reaktionsprodukte wurden mit einem Berthold-TLC-Analyser bestimmt und mit authentischen Standards verglichen, die mit α-Naphthol-Schwefelsäure detektiert wurden. Es konnte jeweils nur ein Produkt nachgewiesen werden, das als Sterylglu-

cosid identifiziert wurde (siehe Fig. 8). Damit konnte nachgewiesen werden, daß die transformierten Hefe-Zellen ein Protein exprimieren, das Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität zeigt. Kontroll-Zellen zeigen keine Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität.

#### 7. Funktionale Expression von genomischen DNA-Sequenzen aus *Saccharomyces cerevisiae* in *E.coli*.

Die aus der von uns klonierten Hafersequenz abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte auffällige Ähnlichkeiten mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz eines genomischen DNA-Stück aus *S. cerevisiae* (siehe Fig. 9) Dabei handelt es sich um das Chromosom XII Cosmid 9470 (Genbank Nr. gb U17246). Die Ähnlichkeit bezog sich auf den 34-Bereich, des in reverser Richtung offenen Leserahmens von bp 32961-36557 (Gen L9470.23). Für dieses putative Gen war bislang keine Funktion bekannt. Teile dieses offenen Leserahmens wurden von uns in *E. coli* funktional exprimiert:

Dazu wurde durch Schneiden mit den Enzymen NdeI und SpeI aus einer Cosmid 9470-DNA-Präparation ein 6359 bp großes Fragment isoliert (Cosmid bp 31384-37744). Diese Sequenz einhielt den gewünschten Leserahmen und konnte durch Klonierung in den Vektor pBluescript II KS (mit EcoRV geschnitten) für weitere Subklonierungen genutzt werden. Dieses Plasmid wurde pBS-HSC genannt. Es wurden vier Subklonierungen durchgeführt, die zur Expression verschieden langer Teile des offenen Leserahmens führen sollten. Diese Klonierungen sind unten tabellarisch aufgeführt:

Klonierung	1	2	3	4
Schneiden von pBS-HSC mit	Eco47III	PstI	EcoRI	SspI
	SmaI		BamHI	
Circa Länge des isolierten				
Fragments in bp	3900	5000	3800	2500
Expressionsvektor	pUC19	pUC8	pBSIIKS	pUC19
Schneiden des				
Expressionsvektors mit	SmaI	PstI	EcoRI	SmaI
			BamHI	

Alle diese Klonierungen führen zu Plasmiden, die für Fusionsproteine kodieren, die im ersten Abschnitt aus dem lacZ Operon und Teilen der Poly-

- 20 -

linker der Vektoren abgeleitet sind und im zweiten Abschnitt aus Polypeptiden bestehen, die Teilen des Gens L9470.23 entsprechen. Abbildung 9 zeigt die abgeleitete Proteinsequenz des offenen Leserahmens (Gen L9470.23). In dieser Abbildung sind die Aminosäuren markiert, mit denen der zweite Abschnitt der Fusionsproteine der verschiedenen Klone beginnt.

Die Plasmide der Klonierungen 1-4 wurden zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. Zu unserer Überraschung konnten wir zellfreien Homogenaten dieser Zellen mit einem in vitro Enzymassay Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität nachweisen. Dazu wurden die Zellen von 15 ml Übernachtskultur (15 ml LB-Ampicillin, 37 °C, 14 h) sedimentiert und in 1,5 ml Lysispuffer aufgenommen (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 15 % Glycerol; 5 mM DTT; 1 mg/ml Lysozym (aus Hühnerei, Boehringer, Mannheim); 200 µM Pefabloc (Merck, Darmstadt). Nach 5minütiger Inkubation bei 20 °C wurden die Suspension auf Eis gestellt und die Zellen durch 3x 3 Sekunden Behandlung mit dem Ultraschallstab aufgebrochen.

Die Reaktionslösung des in vitro Enzymassays hatte ein Volumen von 100 µl und war wie folgt zusammengesetzt (22.5.1996):

50 mM Tris/HCl pH 8,0 (bei 30 °C); 1 mM DTT; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 µl 2 mM Ergosterol in Ethanol; 45 µl *E. coli*-Homogenat; 150.000 dpm UDP-[U-<sup>14</sup>C]-Glucose (2,2 µM).

Die Reaktion wurde nach 45 min (bei 30 °C) durch Mischen mit 0,5 ml Wasser und 1,6 ml Ethylacetat gestoppt. Nach der Phasentrennung durch kurze Zentrifugation wurde die obere organische Phase entnommen und die darin enthaltene Radioaktivität mit einem Scintillationszähler bestimmt:

<i>E. coli</i> Homogenat mit Klon1:	7500 dpm
<i>E. coli</i> Homogenat mit Klon2:	10700 dpm
<i>E. coli</i> Homogenat mit Klon3:	35000 dpm
<i>E. coli</i> Homogenat mit Klon4:	32700 dpm
<i>E. coli</i> Homogenat, untransformiert:	2000 dpm

Von Parallelproben von Klon 2 und 4 wurde die in der organischen Phase vorhandene Radioaktivität einer dünnenschichtchromatographischen Analyse unterzogen:

Die organischen Phasen wurden auf Kieselgel 60 Platten (Merck, Darmstadt) aufgetragen, die mit dem Laufmittel Chloroform:Methanol 85:15 entwickelt wurden. Die R<sub>f</sub>-Werte der radioaktiven, lipophilen Reaktionsprodukte wurden mit einem Berthold-TLC-Analyser bestimmt und mit authentischen Standards verglichen, die mit α-Naphthol-Schwefelsäure detektiert wurden.

Es konnte jeweils nur ein Produkt nachgewiesen werden, das als Sterylglucosid identifiziert wurde (siehe Fig. 10). Damit konnten wir zu unserer Überraschung nachweisen, daß die transformierten *E. coli* Zellen ein Protein exprimieren, das Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität zeigt. Die organischen Phasen von Assay mit nichttransformierten Kontroll-Zellen enthalten zwar auch etwas Radioaktivität; dies ist jedoch kein markiertes Sterylglucosid. Die von dem Gen 9470.23 abgeleitete Aminosäuresequenz wird im Folgenden ScSGTP genannt (siehe Fig. 9).

#### 8. PCR-Versuche mit Arabidopsis, Candida und Kartoffel.

Aus ähnlichen Aminosäuresequenzbereichen zwischen HaSGTP (siehe 4.) und ScSGTP (siehe 7.) konnten Oligonukleotidprimer abgeleitet werden, die für PCR-Versuche eingesetzt wurden:

DW3 = GSIWCIVSIGGIGAYGTHYWICC

WA3 = GTIGTICCISHICCISCRTGRTG

WA6 = GTISKIGTCCAIGGCATIGTRAA

Abkürzungen siehe 4.

Die Polymerase-Chain-Reaction-Methode wurde wie folgt durchgeführt:

Reaktionsmix: 40 µl Aqua dest.; 5 µl Boehringer (Mannheim) 10x PCR-Puffer; je 1 µl 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTDP; je 1 µl 100 µM Oligonukleotidprimer, 0,25 µl Boehringer Taq-Polymerase; 0,5 µl Matrix-DNA.

Reaktionsbedingungen: 94 °C, 3 min; 30x (94 °C, 45 s; 53 °C, 1 min; 72 °C, 2 min); 72°, 10 min.

a.) Primer DW3 und Wa6, als Matrix-DNA wurde cDNA verwendet, die aus Arabidopsis mRNA synthetisiert wurde.

b.) Primer DW3 und Wa6, als Matrix-DNA wurde ein Phagengemisch einer Lamda-ZAP-cDNA-Bank (Stratagene, Heidelberg) von Kartoffel mit ca.  $10^{10}$  Plaque-bildenden-Einheiten pro ml verwendet.

c.) Primer DW3 und Wa3, als Matrix-DNA wurde genomische DNA aus *Candida albicans* (ca. 50 ng/µl) verwendet.

Ergebnis: Eine Agarosegelelektrophorese mit 15 µl der Reaktionsansätze ergab DNA-Banden von ca. 340 bp Länge (Arabidopsis, Kartoffel) und ca. 940 bp Länge (*Candida albicans*).

Diese DNA-Stücke wurden mit dem pGEM-T Vector System (Promega, Heidel-

- 22 -

berg) in einen Plasmidvektor kloniert und teilweise oder vollständig sequenziert. Diese Sequenzen werden in Fig. 11-13 gezeigt (Arabidopsis = Apcr; Kartoffel = Kpcr; Candida = Cpcr). Die aus diesen Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen (ApcrP, KpcrP und CpcrP) wurden mit den Aminosäuresequenzen des Haferklons HaSGTP bzw. des Hefegens L9470.23 (ScSGTP) verglichen (siehe Fig. 14-16):

Zu unserer Überraschung ist

- die Kartoffelsequenz KpcrP zu 86 % identisch mit dem entsprechenden Teil der Hafersequenz HaSGTP,
- die Arabidopsissequenz ApcrP zu 90 % identisch mit dem entsprechenden Teil der Hafersequenz HaSGTP und
- die Candidasequenz CpcrP zu 64 % identisch mit dem entsprechenden Teil der *S. cerevisiae*-Sequenz ScSGTP.

#### 9. Isolation vollständiger Klone aus Arabidopsis

Der Arabidopsis-PCR-Klon Apcr wurde mit einer Methode wie unter 4. beschrieben zur Isolation von vollständigen Klonen aus einer Arabidopsis-Lambda-Zap-cDNA-Bank (erhalten vom Stock Center des MPI für Züchtungsforschung, Köln) genutzt. Es konnte ein ca. 2300 bp langer Klon (im Folgenden AtSGT genannt) vollständig und doppelsträngig sequenziert werden (Fig. 17). Dieser Klon ist 2353 bp lang, und zeigt einen offenen Leserahmen von bp 1 bis bp 2023. Ein Startcodon (ATG) für die Translation beginnt am bp 113. Wird der offene Leserahmen in eine Aminosäuresequenz übersetzt (AtSGTP, Fig. 18), so zeigt die Aminosäuresequenz große Ähnlichkeiten mit der Hafersequenz HaSGTP (siehe Fig. 19).

#### 10. Funktionale Expression des Klons AtSGT in *E. coli*.

Um zu beweisen, daß der Klon AtSGT für eine Sterol-Glucosyltransferase kodiert, wurde er in *E. coli* exprimiert. Die Klonierung erzeugte ein Plasmid (pBS-AtSGT), das für ein Fusionsprotein kodiert, dessen erste Aminosäuren aus dem pBluescript lacZ-Operon und dem Polylinker stammen (normal gedruckt, siehe unten) und dessen folgende Aminosäuren denen des offenen Leserahmens des Klons AtSGT entsprechen (unterstrichen, siehe unten).

Der Anfang des Fusionsprotein sieht wie folgt aus:

MTMITPSSSELTLTGKNKWSSTAVAAALELVDPPGCRNSEFGTPLILSFTFWD....



Bei den mit dem Plasmid pBS-AtSGT transformierten *E. coli*-Zellen wurde überprüft, ob das entsprechende Fusionsprotein exprimiert wurde, indem ein *in vitro* Enzymassay zum Nachweis von Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität mit Zellhomogenaten durchgeführt wurde.

Die Zellen von 1,5 ml Übernachtskultur (1,5 ml LB-Ampicillin, 37 °C, 14 h) wurden sedimentiert und in 1 ml Lysispuffer aufgenommen (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 15 % Glycerol; 5 mM DTT; 1 mg/ml Lysozym (aus Hühnerei, Boehringer, Mannheim); 200 µM Pefabloc (Merck, Darmstadt); 0,1 % Triton X100. Nach 5minütiger Inkubation bei 20 °C wurden die Suspension auf Eis gestellt und die Zellen durch 3x 3 Sekunden Behandlung mit dem Ultraschallstab aufgebrochen.

Die Reaktionslösung des *in vitro* Enzymassays hatte ein Volumen von 50 µl und war wie folgt zusammengesetzt (11.3.1996):

100 mM Tris/HCl pH 8,0 (bei 30 °C); 1 mM DTT; 0,2 % Triton X100; 1 mM Cholesterol; 7,5 µl *E. coli*-Homogenat, 100.000 dpm UDP-[U-<sup>14</sup>C]-Glucose (2,8 µM). Die Reaktion wurde nach 20 min (bei 30 °C) durch Mischen mit 0,5 ml Wasser und 1,6 ml Ethylacetat gestoppt. Nach der Phasentrennung durch kurze Zentrifugation wurde die obere organische Phase entnommen und die darin enthaltene Radioaktivität mit einem Scintillationszähler bestimmt:

<i>E. coli</i> Homogenat mit pBS-AtSGT:	1300 dpm
<i>E. coli</i> Homogenat, untransformiert:	100 dpm (Blindwert)

Von länger inkubierten Parallelproben wurde die in der organischen Phase vorhandene Radioaktivität einer dünnschichtchromatographischen Analyse unterzogen:

Die organischen Phasen wurden auf Kieselgel 60 Platten (Merck, Darmstadt) aufgetragen, die mit dem Laufmittel Chloroform:Methanol 85:15 entwickelt wurden. Die R<sub>f</sub>-Werte der radioaktiven, lipophilen Reaktionsprodukte wurden mit einem Berthold-TLC-Analyser bestimmt und mit authentischen Standards verglichen, die mit α-Naphthol-Schwefelsäure detektiert wurden. Es konnte jeweils nur ein Produkt nachgewiesen werden, das als Sterylglucosid identifiziert wurde (siehe Fig. 20). Damit konnte nachgewiesen werden, daß die transformierten *E. coli* Zellen ein Protein exprimieren, das Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität zeigt. Nichttransformierte Kontrollzellen zeigen keine Sterol-Glucosyltransferase-Aktivität.

Alle molekularbiologischen Arbeitsschritte, die in den Beispielen nicht im Detail beschrieben sind, wurden falls nicht anders angegeben nach Arbeitsvorschriften aus Sambroock, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989): Molecular cloning. A Laboratory Manual. Zweite Ausgabe. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, durchgeführt.

Definitionen:

-Als STEROLE werden hier Substanzen bezeichnet, die über folgende Strukturmerkmale verfügen: Sie bestehen aus einem 5 $\alpha$ -Cholestan-3- $\beta$ -ol- oder 5 $\alpha$ -Cholestan-3- $\alpha$ -ol-Grundgerüst. Dieses Grundgerüst kann an der Seitenkette und/oder durch verschiedene Doppelbindungen in den Ringsystemen modifiziert sein.

-STEROLE IM ENGEREN SINN sind Cholesterol, Ergosterol,  $\beta$ -Sitosterol, Stigmasterol.

-STERYLGLYCOSIDE sind Sterole oder Sterole im engeren Sinn, die über das Sauerstoffatom am C3-Atom mit einem Zuckermolekül oder verknüpft sind. Diese Zucker können z.B. Glucose, Galactose, Mannose, Xylose, Arabinose, andere Zucker oder Zuckerderivate in furanosidischer oder pyranosidischer Form und in  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Verknüpfung sein. Verbindungen, die Glucuronsäure enthalten, sind aus dieser Definition ausgeschlossen.

-FOLGEPRODUKTE VON STERYLGLYCOSIDEN sind zum einen Sekundärprodukte, die in Organismen oder in in vitro-Systemen enzymatisch aus Sterylglycosiden synthetisiert werden können (z.B. Steryldiglycoside, -triglycoside, -oligoglycoside oder acylierte Sterylglycoside). Zum anderen sind dies Substanzen, die mit Methoden der organischen Chemie aus Sterylglycosiden dargestellt werden können.

-STEROL-GLYCOSYLTRANSFERASEN sind Enzyme, die ein Zuckermolekül, besonders aus aktivierten Zuckern oder aktivierten Zuckerderivaten, speziell aus Zuckernukleotiden oder Zuckerderivatnukleotiden auf die OH-Gruppe am C3-Atom von Sterolen oder Sterolen im eigenen Sinn übertragen. Die Übertragung von Glucuronsäure ist aus dieser Definition ausgeschlossen.

- 25 -

-STEROL-GLUCOSYLTRANSFERASEN sind Enzyme, die ein Glucosemolekül, besonders aus aktivierter Glucose, speziell aus Uridindiphosphat auf die OH-Gruppe am C3-Atom von Sterolen oder Sterolen im eigenen Sinn übertragen.

-STEROL-GLYCOSYLTRANSFERASEN IM ENGEREN SINN sind Enzyme, die ein Zuckermolekül, besonders aus aktivierten Zuckern oder aktivierten Zuckerderivaten, speziell aus Zuckernukleotiden oder Zuckerderivatnukleotiden auf die OH-Gruppe am C3-Atom von Sterolen im engeren Sinn übertragen. Die Übertragung von Glucuronsäure ist aus dieser Definition ausgeschlossen.

-STEROL-GLUCOSYLTRANSFERASEN IM ENGEREN SINN sind Enzyme, die ein Glucosemolekül, besonders aus aktivierter Glucose, speziell aus Uridindiphosphat auf die OH-Gruppe am C3-Atom von Sterolen im engeren Sinn übertragen.

-ZUCKER sind in diesem Sinn Hexosen oder Pentosen in furanosidischer oder pyranosidischer Form.

-ZUCKERDERIVATE sind Zucker, die durch Oxidation oder Reduktion oder durch Zufügung oder Entfernung funktionaler Gruppen in ihrer Struktur modifiziert sind. Als Beispiel seien hier N-Acetylglucosamin und Desoxyribose genannt.

-ZUCKERNUKLEOTIDE in dem hier verwendeten Sinn, sind Substanzen, bei denen eine der organischen Basen Thymin, Adenin, Guanin, Uracil oder Cytosin mit einer Ribose bzw. Desoxyribose verknüpft ist und dieser Zucker wiederum über zwei Phosphorsäurereste mit einem weiteren Zuckermolekül verknüpft ist.

-PFLANZENTEILE sind Teile einer Pflanze wie z.B. Blätter, Wurzeln, Samen oder Früchte.

-VEKTOREN sind Nukleinsäurefragmente, die unter bestimmten Bedingungen zur Vervielfältigung befähigt sind und für den Einbau von fremden Nukleinsäurefragmenten zum Zweck der Vermehrung dieses Fragments oder der Expression dieses Fragments (beispielsweise zur Herstellung eines Pro-

teins) benutzt werden. Typische Beispiele sind Plasmide und Phagen.

CHIMÄRES GEN ist ein Nukleinsäurefragment, das aus verschiedenen Teilen zusammengesetzt ist und in dieser Form natürlicherweise nicht vorkommt. Es umfaßt eine für ein Polypeptid kodierende Sequenz und geeignete Steuersequenzen, die die Expression ermöglichen. Die kodierende Sequenz kann dabei hinsichtlich der Steuersequenzen in "sense"- oder "antisense"-Orientierung vorliegen.

-ISOLIEREN ist die Gewinnung bestimmter Dinge aus einem Gemisch verschiedener Dinge. Die Dinge können dabei Substanzen (z.B. Proteine, Nukleinsäurefragmente, mRNA, DNA, cDNA, cDNA-Klone, Gene), Zellteile (z.B. Membranen), Zellen (z.B. Bakterienzellen, Pflanzenzellen, Protoplasten), Zelllinien oder Organismen und deren Nachkommen sein.

#### Literaturverzeichnis

1. Bauw, G.; van den Bulcke, M.; van Damme, J.; Puype, M.; van Montagu, M. und Vandekerckhove, J. (1988) J. Prot. Chem. 7: 194-196
2. King, M. L.; Ling, H. C.; Wang, C.T. und Su, M. (1979) J. Nat. Prod. 42: 701 ff.
3. Miles, D. H.; Stagg, D. D. und Parish, E.J. (1979) J. Nat. Prod. 42: 700 ff
4. Normura, T.; Watanabe, M.; Inoue, K. und Ohata, K. (1978) Japan J. Pharmacol. 28, Suppl. 110P
5. Okuyama, E. und Yamazaki, M. (1983) Yakugaku Zasshi 103: 43 ff.
6. Seki, J.; Okita, A.; Watanabe, M.; Nakagawa, T.; Honda, K.; Tatewaki, N. und Sugiyama, M. (1985) J. Pharm. Sci. 74: 1259-1264
7. Sikorski, R. S. und Hieter, P. (1989) Genetics 122: 19-27
8. Warnecke, D. C. und Heinz, E. (1994) Plant Physiol. 105: 1067-1073
9. Zaret, J. K. und Sherman, F. (1982) Cell 28: 563-573
10. Sambroock, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989): Molecular cloning. A Laboratory Manual. Zweite Ausgabe. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

### P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Isoliertes DNA-Fragment oder rekombinantes DNA-Konstrukt, das mindestens einen Teil einer Sterol-Glycosyltransferase oder Sterol-Glycosyltransferase im engeren Sinn kodierenden Sequenz enthält.
2. Isoliertes DNA-Fragment oder rekombinantes DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 1, das mindestens einen Teil einer Sterol-Glucosyltransferase oder eine Sterol-Glucosyltransferase im engeren Sinn kodierenden Sequenz enthält.
3. Isoliertes DNA-Fragment oder rekombinantes DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 1 oder 2, das mindestens eine enzymatisch aktive Sterol-Glycosyltransferase oder Sterol-Glycosyltransferase im engeren Sinn, insbesondere Sterol-Glucosyltransferase oder Sterol-Glucosyltransferase im engeren Sinn, kodiert, wobei das kodierte Protein nach Expression direkt oder nach Prozessierung oder Modifikation in vivo oder in vitro unter geeigneten Bedingungen enzymatisch wirksam ist.
4. Isoliertes DNA-Fragment oder rekombinantes DNA-Konstrukt gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-3, wobei die Nukleinsäure aus
  - a) Pflanzen oder
  - b) Pflanzen, Pilzen und Bakterien oder
  - c) Eukaryonten oder
  - d) vielzelligen Eukaryonten oder
  - e) Pilzen oder
  - f) Bakterienisolierbar ist.
5. Isoliertes DNA-Fragment oder rekombinantes DNA-Konstrukt gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-4, das die folgenden Eigenschaften

aufweist:

a) die abgeleitete Aminosäuresequenz umfaßt mindestens 14 aufeinanderfolgende Aminosäuren, die mit den aus Fig. 4 oder 18 aufgeführten Sequenzen identisch sind, und

b) die abgeleitete Aminosäuresequenz umfaßt die Aminosäuresequenz HHGG.

6. Isoliertes DNA-Fragment oder rekombinantes DNA-Konstrukt gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-4, das aus Pflanzen isolierbar ist und dessen abgeleitete Aminosäuresequenz die Aminosäuresequenz HHGGxxxxxxxxxxxxPxxxxxxxxxQ, wobei x beliebige Aminosäuren darstellt, umfaßt.

7. Isoliertes DNA-Fragment oder rekombinantes DNA-Konstrukt gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-4, das

a) aus Pflanzen isolierbar ist,

b) eine Länge von mindestens 400 bp aufweist, und

c) dessen abgeleitete Aminosäuresequenz mindestens 8 aufeinanderfolgende Aminosäuren umfaßt, die mit den aus Fig. 4 oder 18 aufgeführten Sequenzen identisch sind.

8. Isoliertes DNA-Fragment oder rekombinantes DNA-Konstrukt gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-4, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz

a) über eine Länge von mindestens 350 Aminosäuren mindestens zu 75%, insbesondere zu 90%, speziell zu 100%, identisch zu den Sequenzen in Fig. 21 oder 22 ist,

b) über eine Länge von mindestens 150 Aminosäuren mindestens zu 70 % identisch mit der Sequenz in Fig. 16 ist, oder

c) über eine Länge von 100 Aminosäuren mindestens zu 93 % identisch mit der Sequenz in Fig. 15 ist.

9. Protein das aus einer der in Fig. 1-3 oder 11-22 gezeigten Nukleinsäuresequenzen abgeleitet ist.

10. Plasmide, Viren oder andere Vektoren, dadurch gekennzeichnet, daß sie Nukleinsäuren entsprechend einem oder mehreren der Ansprüche 1-8 enthalten.

11. Genomische Klone, dadurch gekennzeichnet, daß sie Gene oder Teile von Genen enthalten, die für eine Sequenz oder Teile davon entsprechend einem oder mehreren der Ansprüche 1-8 kodieren.
12. Chimäres Gen, das in der Lage ist, in einer transformierten Zelle den Gehalt an Sterol-Glycosyltransferase oder Sterol-Glycosyltransferase im engeren Sinn, insbesondere Sterol-Glucosyltransferase oder Sterol-Glucosyltransferase im engeren Sinn, zu verändern.
13. Chimäres Gen gemäß Anspruch 12, das ein Nukleinsäurefragment umfaßt, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz mindestens zu 60 % der Sequenz in Fig. 23 oder Teilen davon entspricht und das in wirksamer Form mit geeigneten Steuersequenzen verknüpft ist.
14. Chimäres Gen gemäß Anspruch 12, das ein in einem oder mehreren der Ansprüche 1-8 definiertes DNA-Fragment umfaßt.
15. Chimäres Gen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 12-14, dadurch gekennzeichnet, daß es in der Lage ist in einer transformierten Zelle
  - a) die Synthese von Sterylglycosiden oder biosynthetischen Folgeprodukten, wie acylierte Sterylglycoside oder Steryloligoglycoside, auszulösen
  - b) den Gehalt an Sterylglycosiden oder Folgeprodukten zu verändern, oder
  - c) neue Sterylglycoside oder Folgeprodukte hervorzubringen.
16. Chimäres Gen gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es in der Lage ist in einer transformierten Zelle die Synthese von Sterylglycosiden auszulösen, den Gehalt an Sterylglycosiden zu verändern oder neue Sterylglycoside hervorzubringen.
17. Chimäres Gen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 12-16, dadurch gekennzeichnet, daß die Konstruktion in "sense" und/oder "antisense"-Orientierung vorliegt.
18. Transfomierte Zellen, transformierte Mikroorganismen, Pflanzen oder

Pflanzenteile, die ein chimäres Gen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 12-18 enthalten.

19. Transfomiierte Zellen, transformierte Mikroorganismen, Pflanzen oder Pflanzenteile gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie Sterol-Glycosyltransferasen oder Sterol-Glycosyltransferasen im engeren Sinn, insbesondere Sterol-Glucosyltransferasen oder Sterol-Glucosyltransferasen im engeren Sinn enthalten, die in diesen natürlicherweise nicht oder in anderer Form oder in anderer Konzentration vorkommen.

20. Transfomiierte Zellen, transformierte Mikroorganismen, Pflanzen oder Pflanzenteile gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie Sterol-Glycosyltransferase-Aktivitäten oder Sterol-Glycosyltransferase-Aktivitäten im engeren Sinn, insbesondere Sterol-Glucosyltransferase-Aktivitäten oder Sterol-Glucosyltransferase-Aktivitäten im engeren Sinn, zeigen, die in diesen natürlicherweise nicht oder in anderer Höhe oder in anderer Spezifität vorkommen.

21. Transfomiierte Zellen, transformierte Mikroorganismen, Pflanzen oder Pflanzenteile gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie Steryl-Glycoside oder Folgeprodukte enthalten, die in diesen natürlicherweise nicht oder in anderer Menge oder in anderer Form, insbesondere mit anderen Sterol oder Zuckerkomponente oder anderer Verknüpfung, vorkommen.

22. Pflanzen oder Pflanzenteile gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 18-21, dadurch gekennzeichnet, daß sie toleranter oder resistenter gegenüber einem oder mehreren der schädlichen Umwelteinflüsse

- Trockenheit,
- hohe Salzkonzentration im Substrat,
- Kälte oder Frost,
- Pilzbefall

sind als nichttransformierte Kontrollpflanzen.

23. Pflanzen oder Pflanzenteile gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß sie toleranter oder resistenter gegenüber Kälte oder Frost sind als nichttransformierte Kontrollpflanzen.

24. Transfomiierte Mikroorganismen gemäß einem oder mehrerer der An-



sprüche 18-22, insbesondere Bakterien oder Hefen, dadurch gekennzeichnet, daß sie resistenter oder toleranter gegenüber einem oder mehreren der Umwelteinflüsse

- hohe Salz- oder Ethanolkonzentration im Medium,
- Kälte oder Frost,
- hohe Temperaturen

sind als nichttransformierte Mikroorganismen.

25. Verfahren zum Herstellen von Sterylglycosiden oder Folgeprodukten umfassend das Kultivieren von transformierten Zellen, transformierte Mikroorganismen, Pflanzen oder Pflanzenteilen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 18-24.

26. Verfahren gemäß Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, da Homogenisate oder Extrakte der transformierten Zellen, transformierten Mikroorganismen, Pflanzen oder Pflanzenteile in vitro kultiviert werden.

27. Sterylglycoside oder Folgeprodukte erhältlich durch das Verfahren gemäß Anspruch 25 oder 26.

28. DNA-Fragment, erhältlich nach einem der folgenden Verfahren oder Teilen davon:

a) Verwenden von einer der in Fig. 1-3 oder 11-13 oder 17 gezeigten Nukleinsäuresequenzen als Hybridisierungsprobe;

b) Verwenden der in Fig. 4, 5, 14-16, 18, 19, 21 oder 22 gezeigten Aminosäuresequenzen zur Synthese von Peptiden oder Proteinen, die zur Gewinnung von Antisera dienen; oder

c)i) Vergleichen der in Fig. 1-3, 11-13 oder 17 gezeigten Nukleotidsequenzen oder der daraus abgeleiteten, in Fig. 4, 5, 14-16, 18, 19, 21 oder 22 gezeigten Aminosäuresequenzen untereinander oder mit bereits bekannten Nukleotidsequenzen oder daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen,

ii) Ableiten und Synthetisieren von geeigneten spezifischen Oligonukleotiden aus ähnlichen Bereichen dieser Sequenzen, und

iii) Benutzen dieser Oligonukleotide, um mit Hilfe eines sequenzabhängigen Protokolls, insbesondere der PCR-Methode, Nukleinsäuren herzustellen, die für Sterol-Glycosyltransferasen oder Sterol-Glycosyltransferasen im engeren Sinn, insbesondere Sterol-Glucosyltransferasen oder Sterol-Glucosyltransferasen im engeren Sinn oder Teilen davon kodieren.

29. Chimäres Gen, das ein DNA-Fragment gemäß Anspruch 28 enthält und das in der Lage ist, in einer transformierten Zelle den Gehalt an Sterol-Glycosyltransferase oder Sterol-Glycosyltransferase im engeren Sinn, insbesondere Sterol-Glucosyltransferase oder Sterol-Glucosyltransferase im engeren Sinn, zu verändern.

30. Transfomiierte Zellen, die ein chimres Gen gemäß Anspruch 29 enthalten.

31. Transfomiierte Zellen gemäß Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß sie Sterol-Glycosyltransferasen oder Sterol-Glycosyltransferasen im engeren Sinn, insbesondere Sterol-Glucosyltransferasen oder Sterol-Glucosyltransferasen im engeren Sinn, enthalten, die in diesen natürlicherweise nicht oder in anderer Form oder in anderer Konzentration vorkommen.

32. Organismen, insbesondere Mikroorganismen wie Bakterien und Hefen, deren Gen oder Gene, die für Sterol-Glycosyltransferasen oder Sterol-Glycosyltransferasen im engeren Sinn, insbesondere Sterol-Glucosyltransferasen oder Sterol-Glucosyltransferasen im engeren Sinn, kodieren, durch Transformation mit geeigneten chimären Genen deletiert oder unterbrochen sind.

33. Organismen gemäß Anspruch 32, die eine Veränderung des Gehalts an Sterylglycosiden und/oder Folgeprodukten aufweisen.

34. Organismen gemäß Anspruch 32 oder 33, wobei das chimäre Gen ein DNA-Fragment gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1-9 oder 28 umfaßt.

35. Sterol-Glycosyltransferasen oder Sterol-Glycosyltransferasen im engeren Sinn, insbesondere Sterol-Glucosyltransferasen oder Sterol-Glucosyltransferasen im engeren Sinn, oder Teile davon oder Fusionsproteine mit den genannten Transferasen, die aus Organismen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 18-25 oder 30-32 erhältlich sind.

36. Antiseren oder Produkte aus Antiseren, die gegen ein Protein gemäß Anspruch 35 oder Teilen davon gerichtet und durch Immunisierung von

Tieren erhältlich sind.

37. Antikörper oder Teile davon, die gegen ein Protein gemäß Anspruch 35 oder Teilen davon gerichtet sind und nicht durch klassische Immunisierung von Tieren erhältlich sind.

1/25

Fig. 1

A.									
1:	GGTATGGG	ACGTGACGGT	TGAAGAATCA	TTGGATGGAG	CGGATATACC	ATATAGACCT			
61:	CCTATGCAGA	TTGTTATACT	TATTGTGGGT	ACAAGGGGAG	ATGTTCAGCC	ATTGTGTGCT			
121:	ATAGGAAAC	GCTTACAGGA	TCATGGACAC	CGTGTGAGAT	TAGCCACTCA	TGCCAACTTT			
181:	AAGAGTTCG	TACTGACAGC	TGGGCTGGAG	TTTTTTCCAC	TTGGTGGAGA	TCCAAAAATA			
241:	CTTGCTGAAT	ACATGGTGAA	GAATAAAGGG	TTCCTGCCAT	CAGGCCCATC	AGAAATTCCT			
301:	ATTCAAAGAA	AGCAGATGAG	AGAAATTATA	TTTTCTTG					
B.									
1:	CCTCATGGAT	ACATCTGGAG	TCCTCATCTT	GTTCCAAAC	CAAAAGACTG	GGGCCCCAGG			
61:	ATTGATGTTG	TTGGATTCTG	CTTCCTCGAT	CTTGCTTCTG	ATTACGAACC	ACCTGAAGAA			
121:	CTTGTAAT	GGCTTGAAGC	TGGTGACNAG	CCCATTTATG	TTGGTTTCGG	TAGCCTTCCA			
181:	GTTCAGGATC	- CAACAAGAT	GACCGAACC	ATCATCCAAG	C				

2/25

Fig. 2a

```

1:   CGAATCCTCC GGCTTCTCAT CCCGCATCTC GTCGGCCGCT CTTTCCCCC TCCCCGCCGC
61:  AACAGCAGGA GGTCCAGGCG GAGGAGTAAC CGCCGCGCCA AGTCTGGAAT CTCCGGGCCC
121: ACCGGGCCAG CAGCGGGGGC GGTACAAATG GCCGATGCCG AGCCGACCGG CGGGGGAGGC
181: AAGGGCGCGG AAGATATAGG AGGAGCGGCG GAGGCGCACA GTCGCGACAG CCCTGCCTCG
241: GCGGCACTAC CCACGGCGCC GTCGACGTCT TCCTCTTCCG CAGACAACGG GAACCTCCAT
301: AGATCAAGCA CTATGCCAGG AGTGATCAAG GATGCTGAAA TAATTACTGA AACTACAGGA
361: CCGTCGAATT TTGAAAGGTC GAAAACCGAG AGACGCCGGC AGAATAATGA TCCTGCTAAA
421: CAGTTATTGG ATGATAAGAT TTCCGTAAGG AAAAAGCTCA AAATGCTAAA CCGCATTGCT
481: ACAGTGAGAG ATGATGGAAC TGTGGTTGTT GATGTACCAA GCTCTCTGGA TTTGGCTCCA
541: CTTGATGTTG GAGGAGAGGA TGGCTATGGT GATGTCACTG TTGAAGAATC ATTGGATGGA
601: GCAGATATAC CATCCATACC TCCTATGCAG ATTGTTATAC TTATTGTGGG TACAAGGGGA
661: GATGTTTCAGC CATTTGTTGC TATAGCAAAA CGCTTACAGG ATTATGGACA CCGTGTGAGA
721: TTAGCCACTC ATGCCAACTA TAAGGAGTTC GTACTGACAG CTGGGCTGGA GTTTTTCCCA
781: CTTGGTGAG ATCCAAAACCT ACTTGCTGAA TACATGGTGA AGAATAAAGG GTTCCTGCCT
841: TCAGGCCCAT CAGAAATTCC TATTCAAAGA AAGCAGATGA AAGAAATTAT ATTTTCCTTG
901: CTGCCTGCAT GCAAAGATCC TGATCCTGAC ACTGGCATTG CTTTCAAAGT GGATGCAATT
961: ATTGCTAATC CACCGGCATA TGGACATACA CACGTGGCAG AGGCGCTAAA AGTACCCATT
1021: CATATATTCT TTACCATGCC ATGGACGCCA ACTAGTGAAT TTCCTCATCC TCTTTCTCGC
1081: GTGAAAACAT CAGCTGGATA TCGACTTTCT TACCAAATTG TTGACTCCAT GATTTGGCTT
1141: GGGATACGGG ATATGATAAA TGAATTCAGG AAAAAGAAGT TGAAGCTACG CCCAGTAACA
1201: TACCTAAGTG GTTACAGGG TTCTGGAAGT GACATTCTCT ATGGATACAT CTGGAGTCCT
1261: CATCTTGTC CAAAACCAA AGACTGGGGC CCAAGATTG ATGTTGTTGG ATTCTGCTTC
1321: CTCGATCTTG CTTCTGATTA CGAACCACCT GAAGAACTCG TGAAATGGCT TGAAGCTGGT
1381: GACAAGCCCA TTTATGTTGG TTTCGGTAGC CTTCCAGTTC AAGATCCAAC AAAGATGACT
1441: GAAACCATTA TCCAAGCACT TGAAATGACC GGACAGAGAG GTATTATTAA CAAAGGTTGG
1501: GGTGGCCTCG GAACCTTGGC AGAACCGAAA GATTCCATAT ATGTACTTGA CAACTGCCCT
1561: CATGACTGGC TTTTCCTGCA GTGTAAGGCA GTGGTGCATC ATGGTGGAGC TGGAAACGACA
1621: GCTGCCGGCC TGAAAGCAGC GTGCCCTACA ACTATTGTAC CTTTCTTTGG CGACCAACAA
1681: TTCTGGGGAG ACCGGGTGCA TGCTCGAGGG GTAGGGCCTG TGCCTATACC AGTTGAACAA

```

ERSATZBLATT (REGEL 26)

3/25

Fig. 2b

Fortsetzung von Abbildung 2

```
1741: TTCAATTTC AGAAACTGGT TGATGCTATG AAGTTCATGT TGGAGCCAGA GGTAAAGAA
1801: AAGGCTGTGG AGCTTGCCAA GGCCATGGAA TCTGAGGATG GTGTAACCGG TGCAGTTAGG
1861: GCATTCTCTCA AACATCTGCC TTCTTCAAAA GAAGATGAAA ATTACACCCC ACCTACGCCG
1921: CATGGTTTCC TAGAGTTCCT AGGCCCGGTA AGTAAATGTT TGGGGTGCTC TTAGGTGCTG
1981: ATTAGATGAA GGATACACCA TTCCTCCCTG CAAAAGGAAG TGATTAAGGA AAAAAGGCTG
2041: TTGGGTGACT GAGCTATGCT GTTTTGTCG ACAGAATGT GGAAGCCCAT GTAAGAAGTT
2101: GAAGAACATC CAGCCAGGAG TCGGGCTTT ATCGTTTCGC ATCGTTTCGTT TGTGGTTTTT
2161: TGTGTTGTG TAAAGAATAC TTGTCCTCTGT AATTGATAC ATCATTTTGG TGTGGTTGCA
2221: ACCTTGGTGT GCAGCAACCG ATGATCTCAC ATGTATGACC AGGCATCTGT GTATATGGAA
2281: AACTTTAAGA GGCAGATTAA AAAAAAAAAA AAAAAA
```

Fig. 3a

A.

```

wal8e      : -----GGGTATGGGGACGTGACGGTTGAAGAATCATTTGGATGGG
HaSGT      : CTTGATGTTGGAGGAGAGGATGGCTATGGTGATGTCACTGTTGAAGAATCATTTGGATGGG
            ** ***** ** ** ** *****
wal8e      : GCGATATACCATATAGACCTCCTATGCAGATTGTTATCTTATTTGGGTACAAGGGG
HaSGT      : GCAGATATACCATCCATACCTCCTATGCAGATTGTTATCTTATTTGGGTACAAGGGG
            ** ***** * *****
wal8e      : GATGTTCAGCCATTGTTGCTATAGGAAAAACGCTTACAGGATCATGGACACCGTGTGAG
HaSGT      : GATGTTCAGCCATTGTTGCTATAGCAAAACGCTTACAGGATTATGGACACCGTGTGAG
            ***** ** *****
wal8e      : TTAGCCACTCATGCCAACTTTAAGGAGTTGCTACTGACAGCTGGGCTGGAGTTTTTTCC
HaSGT      : TTAGCCACTCATGCCAACTATATAAGGAGTTGCTACTGACAGCTGGGCTGGAGTTTTTTCC
            ***** ** *****
wal8e      : CTTGTTGGAGATCCAAAAATACCTTGCTGAATACATGTTGAAGAATAAAGGGTTCCTGCC
HaSGT      : CTTGTTGGAGATCCAAAAATACCTTGCTGAATACATGTTGAAGAATAAAGGGTTCCTGCC
            ***** ** *****
wal8e      : TCAGGCCCATCAGAAAATTCCTATTCAAAGAAAAGCAGATGAGAGAAATTATATTTTCCTTG
HaSGT      : TCAGGCCCATCAGAAAATTCCTATTCAAAGAAAAGCAGATGAGAGAAATTATATTTTCCTTG
            ***** ** *****

```

Fig. 3b

```
wal9er
HaSGT      :
             :  -----CCTCATGGATACATCTGGAGTCCT
             :  TACCTAAGTGGTTCACAGGGTTC TGAAGTGACATTCCTCATGGATACATCTGGAGTCCT
             :  *****
wal9er      :
HaSGT      :  CATCTTGTTCAAAACCAAAAGACTGGGGCCCCCAGGATTGATGTTGTTGGATTCTGCTTC
             :  CATCTTGTTCCTTCTGATTACGAACTGGGGCCCCCAAGATTGATGTTGTTGGATTCTGCTTC
             :  *****
wal9er      :
HaSGT      :  CTCGATCTTGCTTCTGATTACGAAACCACTGAAGAACTTGTGAAATGGCTTGAAGCTGGT
             :  CTCGATCTTGCTTCTGATTACGAAACCACTGAAGAACTCGTGAATGGCTTGAAGCTGGT
             :  *****
wal9er      :
HaSGT      :  GACAAGCCCCATTATGTTGGTTTCGGTAGCCTTCCAGTTCAGGATCCAAAGATGACC
             :  GACAAGCCCCATTATGTTGGTTTCGGTAGCCTTCCAGTTCAGGATCCAAAGATGACT
             :  *****
wal9er      :
HaSGT      :  GAAACCATCATCCAAGC-----
             :  GAAACCATTATCCAAGCACTTGAAATGACCGACAGAGAGGTATTATTAACAAAGGTTGG
             :  *****
```



Fig. 4

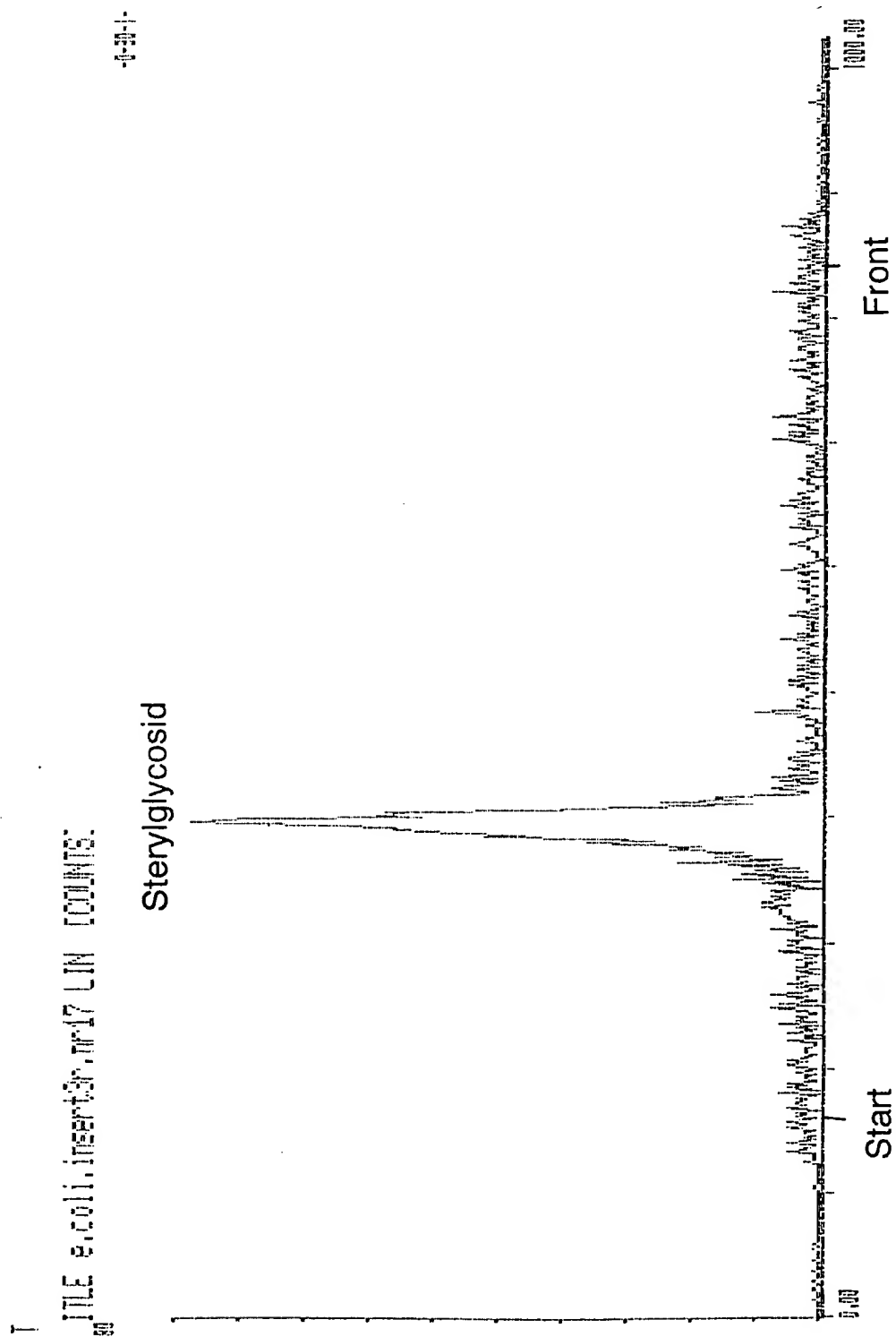
1: RILRLLIPLHL VGRSFPFPPRR NSRRSRRRSN RRAKSGISGP TGQTAGAVQM ADAEPTGVGG  
61: KGAEDIGGAA EAHSRDSPAS AALPTAPSTS SSSADNGNLH RSSTMPGVIK DAEIITETTG  
121: PSNFEERSKTE RRRQNNDPAK QLLDDKISVR KKLKMLNRIA TVRDDGTVVV DVPSSLDLAP  
181: LDVGGEDAYG DVTVEESLDG ADIPSIPPMQ IVILIVGTRG DVQPFVAIAK RLQDYGHRVR  
241: LATHANYKEF VLTAGLEFFP LGGDPKLLAK YMVKNKGFLP SGPSEIPIQR KQMKETIFSL  
301: LPACKDPPDP TGIPFKVDAL IANPPAYGHT HVAEALKVPI HIFFTMPWTP TSEFPHPLSR  
361: VKTSAGYRLS YQIVDSMIWL GIRDmineFR KKKLKLRPVT YLSGSQSGS DIPHYIWSF  
421: HLVPKPKDWG PKIDVVGFCF LDLASDYEPP EELVKWLEAG DKPIYVVGFS LPVQDPTKMT  
481: ETIIQALEMT GQGIINKGW GGLGTLAEPK DSIYVLDNCP HDWFLQCKA VVHHGGAGTT  
541: AAGLKAACPT TIVPFFGDQQ FWGDRVHARG VGPVPIPVEQ FNLQKLVDAM KFMLEPEVKE  
601: KPVELAKPME SEDGVTGAVR AFLKHLPPSSK EDENSPPTTP HGFLEFLGPV SKCLGCS

Fig. 5

N-TERMINUS : -DVGGEDGYGDVTVEE-  
HaSGTP : LDVGGEDAYGDVTVEESLDG  
\*\*\*\*\*

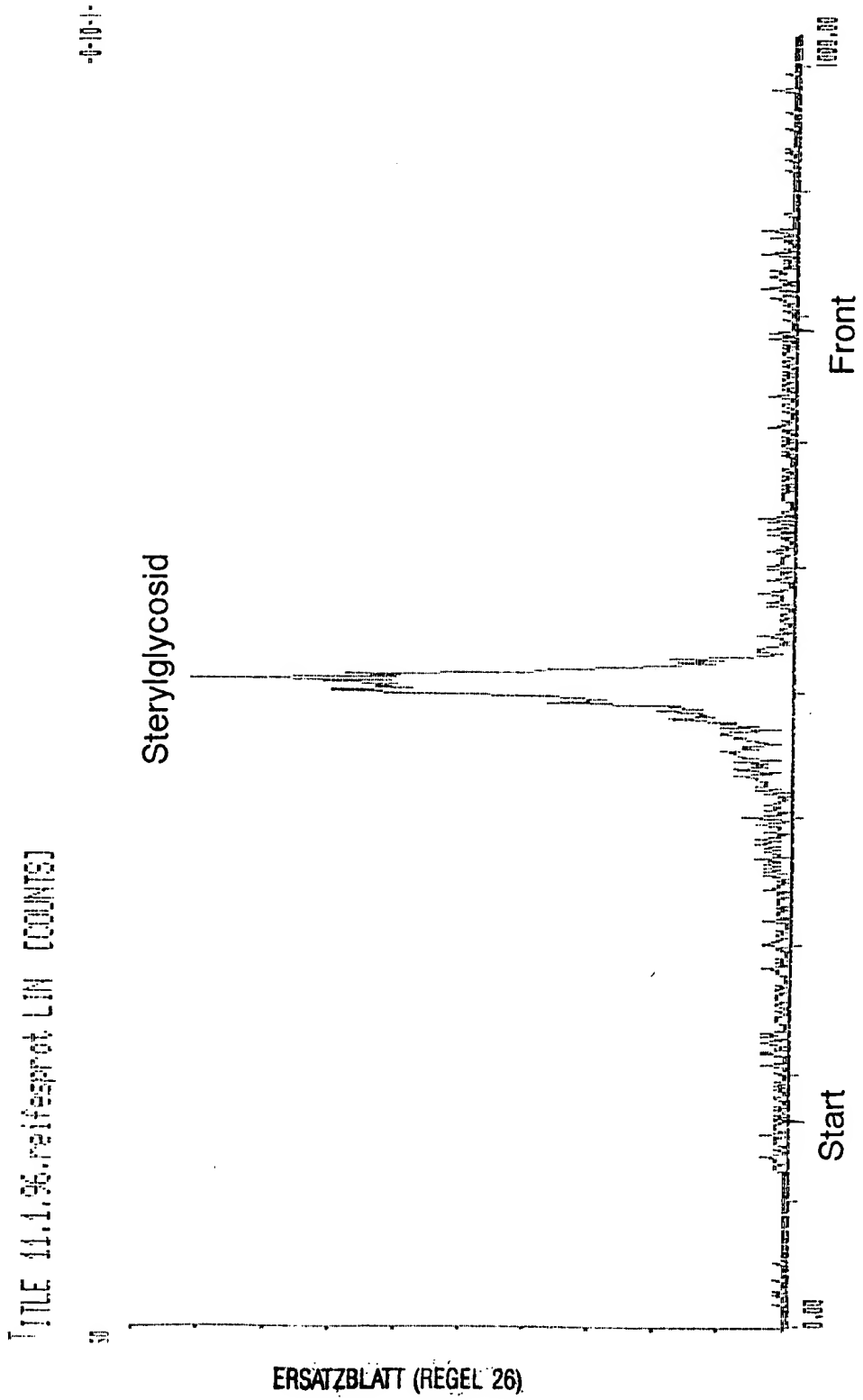
7/25

Fig. 6a



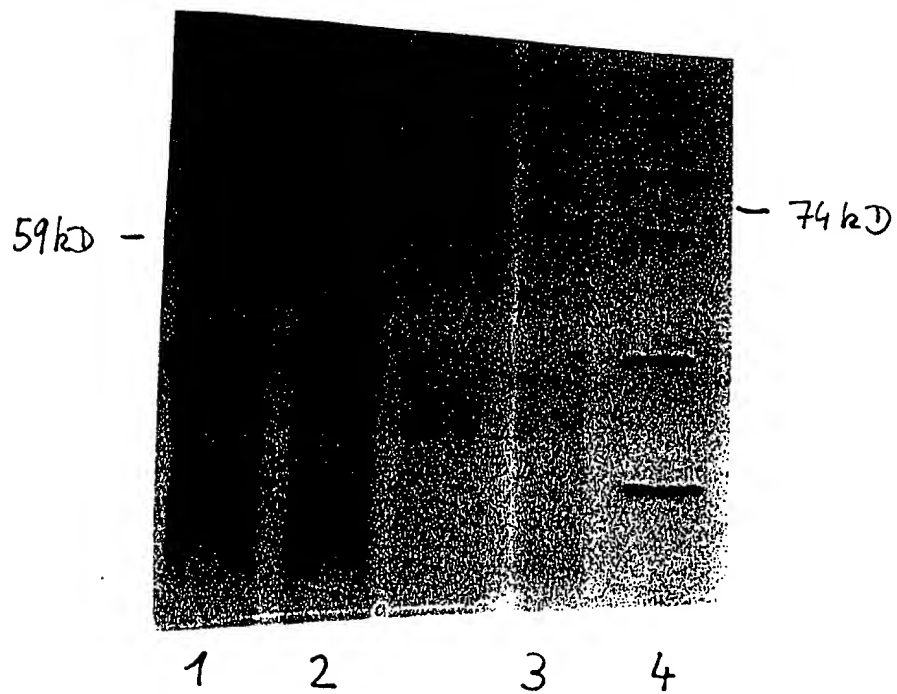
8/25

Fig. 6b



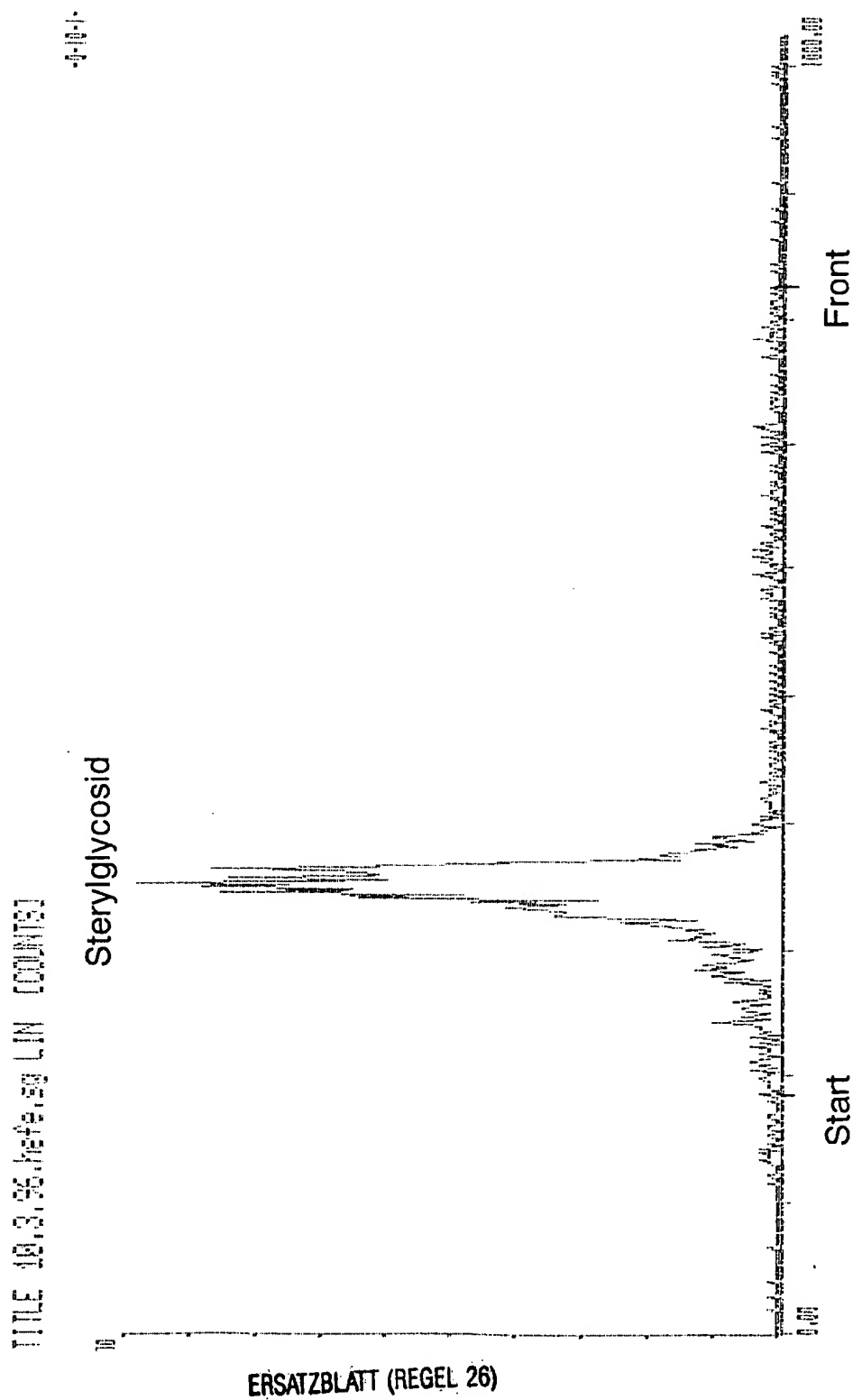
9/25

Fig. 7



10/25

Fig. 8



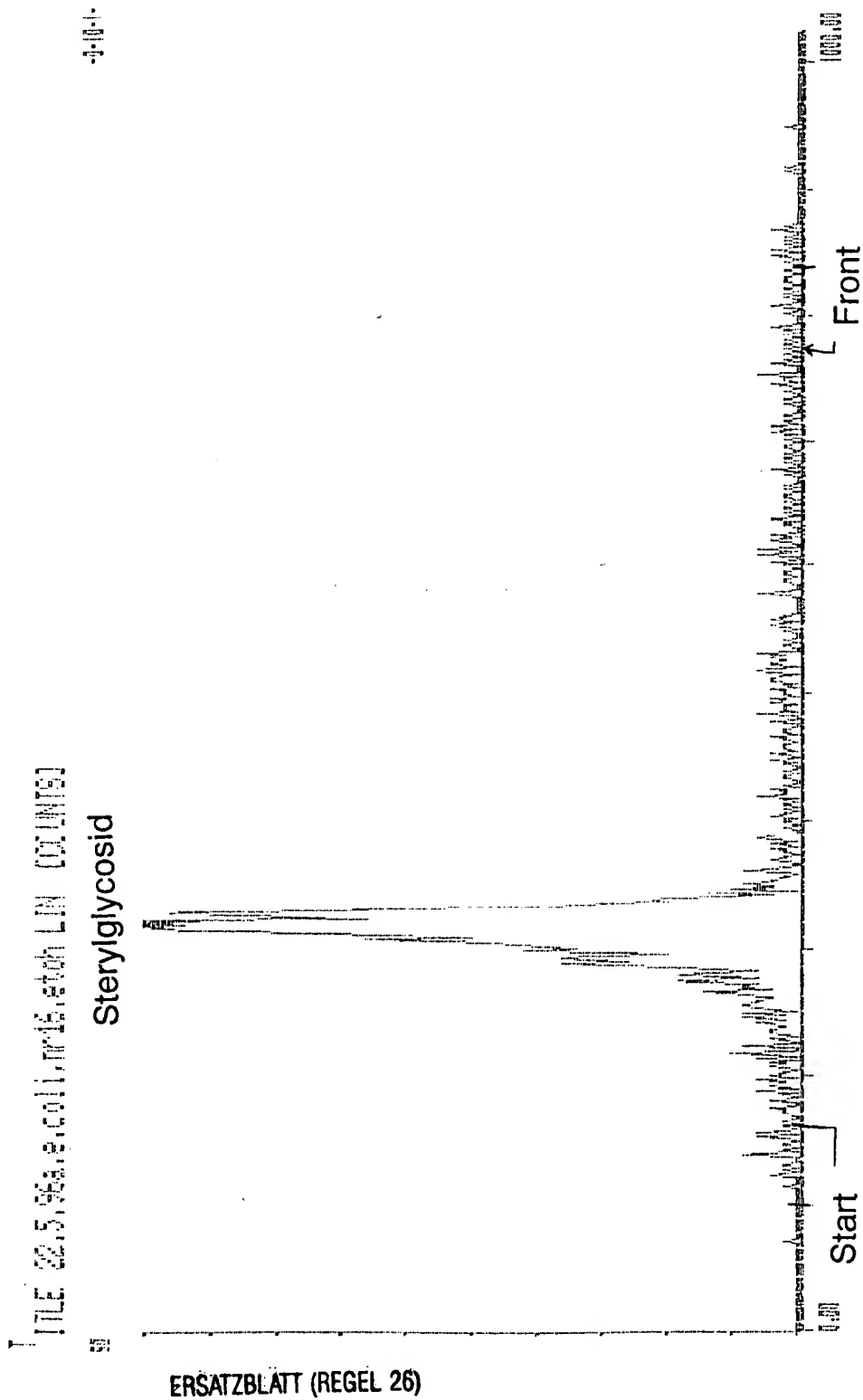
11/25

Fig. 9

1: MPITQIISAS DSEAGPKPSI SLVPDKPSEP ETSPRHHRLS RSLSKFKRWR <sup>→1</sup> GRSNSSLSMG  
 61: SSEQQELQDS <sup>→2</sup> PNEARSDDDE NGYNNDNADD LAKSKYMMKS IAGLLTTASV YAGMNN AQEM  
 121: NVLSQVDSEE SDSSDSFQEN IGRNEVKSKK ENLTKTSHPE VPRLDKRKPT LFD FSITREK  
 181: LSKDNVAKLR QRFCLDEQEP FLNDFPAWLL KDVLVQGHIF ITTKHFLFFA YLPKNPRSVK  
 241: MSGNLNIRTK LIRSTRYWCV LKNHLFSMYT SSTEYFPVL TIDLREVQKI ETQKHTLNGS  
 301: ATKTFKLYTD ESTFKFNADS EFSAKSWVNA LKKEQFAAQN <sup>→3</sup> SENNSISLKI PLPNII EIDD  
 361: QPIVNKALTL RLRALESSQT YAIDDFMFVF MDGSGSQVKE SLGEQLAILQ KSGVNTLYYD  
 421: IPAKSKSSF GKETPATVEQ <sup>→4</sup> KNGEDSKYL NVPTSAVPSS ENGKKSFRF RERSNSWFRF  
 481: AKPLEDSQVE DVEEIKDAA NDIDSSVHST IHIHEQEDSQ EQTVAWKPSH LKNFAEMWAA  
 541: KPIHYRNKFI PFQKDDTYLI KETEEVSANE RFRYHFKFNK EKSLISTYYT YLNRNVPVYG  
 601: KIIVSNDTVC FRSL LPGSNT YMVLP LVDVE TCYKEKGFRF GYFVLVIVIH GHEELFF EFS  
 661: TEVARDDIER ILLKLLDNIY ASSAEGSNIS SASLGDVQHN PDSAKLKLFE DKINAEGFEV  
 721: PLMIDENPHY KTSIKPNKSY KFGLLTIGSR GDVQPYIALG KGLIKEGHQV VIITHSEFRD  
 781: FVESHGIQFE EIAGNPVELM SLMVENESMN VKMLREASSK FRGWIDALLQ TSWEVCNRRK  
 841: FDILIESPSA MVGIHITEAL QIPYFRAFTM PWTRTRAYPH AFIVPDQKRG GNYNYLTHVL  
 901: FENVFWKGIS GQVNKWRVET LGLGKTNLFL LQQNNVPFLY NVSPTIFPPS IDPSEWVRVT  
 961: GYWFLDDKST FKPPAELQEF ISEARSKGKK LVIYIGFSIV VSNAKEMTEA LVEAVMEADV  
 1021: YCILNKGWSE RLGDKAAKKT EVDLPRNILN IGNVPHDWLF PQVDAAVHHG GSGTTGASLR  
 1081: AGLPTVIKPF FGDQFFYAGR VEDIGVGIAL KKLNAQTLAD ALKVATTNKI MKDRAGLIKK  
 1141: KISKEDGIKT AISAIYNELE YARSVTL SRV KTPRKKEENV DATKLTPAET TDEGWTMI

12/25

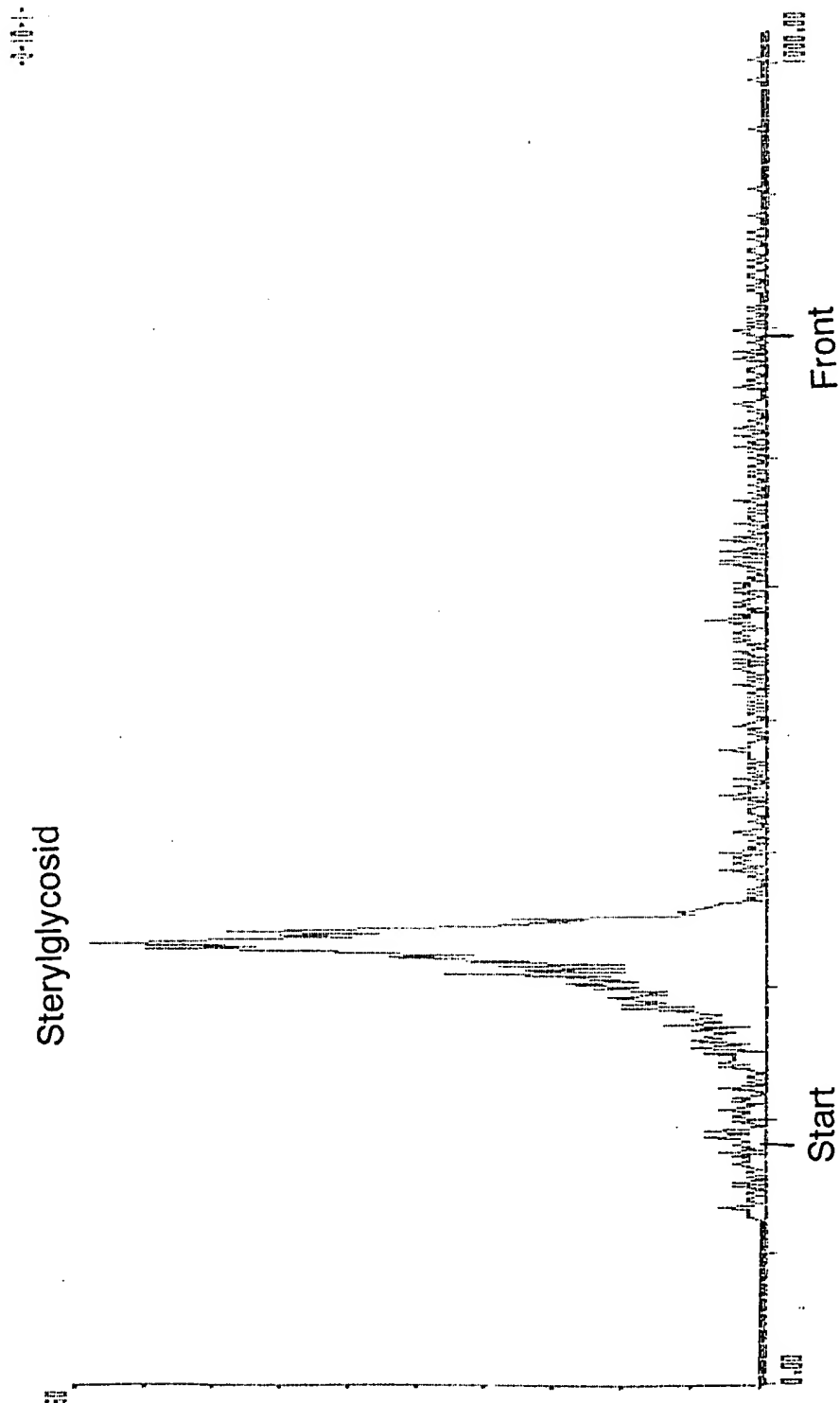
Fig. 10a



13/25

Fig. 10b

TITLE 22.5.96b.e.coli.nr37.etch LIN [COUNTS]





14/25

Fig. 11 : Apcr

```

1:   GGGGGGATGT TCAGCCTTTT GTTGCAATAG CCAAACGGCT TCAGGACTAT GGCCATCGAG
61:  TTAGACTTGC AACTCATGCA AATTTTAAAG AGTTGTGTTT GACTGCTGGA TTAGAGTTTT
121: ATCCTCTAGG TGGAGATCCA AAAGTGCTCG CCGGTTATAT GGTTAAGAAC AAGGGCTTTT
181: TGCCATCAGG CCCTTCAGAG ATTCCAATTC AACGAAACCA AATGAAGGAC ATCATATATT
241: CTCTACTTCC AGCATGTAAA GAACCTGATC CAGATTCTGG GATTTCCTTT AAAGCTGATG
301: CAATTATTGC CAACCCCTCCA GCGTATGGAC ATACCCATGT GGCAGAAGCA CTGAAGATAC
361: CGATTACAGT ATTTTTCACC ATGCCCTGGA CCCCCAC

```

Fig. 12 : Kpcr

```

1:   CGCGGGGGGA TGTCCAGCCC TTTACTGCAA TTGGCAAGCG TCTGCAGGAT TTTGGCCATC
61:  GAGTGAGGTT GCGGACCCAT GCAAATTTC AAGAGTTTGT CTTGAGTGCT GGATTGGAAT
121: TCTATCCCCCT TGGGGGTGAT CCAAAAATTT TGGCTGGATA CATGGTAAAA AACAAAGGAT
181: TCTTACCTTC CGGACCTTCA GAAATCCCTG TTCAGAGAAA TCAGATGAAG GAGATTATAT
241: ACTCTCTACT TCCAGCCTGC AAAGAGCCTG ATATGGATAC AGGAGTTCCC TTCAAAAGCAG
301: ATGCAATTAT TGCTAAATCCC CCAGCATATG GGCATGTACA TGTTGCAGAA GCATTGCAAA
361: TCCCAATTCA TATATTTTTC ACCATGCCCT GGACCCCCAC A

```

15/25

Fig. 13 : Cper

```
1:   GGTATTTCCG GACAAAGTAA TAAATGGAGA GTTGAGGAAT TAGATTGGCC AAAGACCAAT
61:   TTATACAGGT TGCAACAGAC AAGGGTCCCC TTCTTGTATA ATGTTTCACC CGCTATATTA
121:  CCGCCATCTG TTGATTTTCC TGATTGGATT AAAGTAACTG GATACTGGTT TTTAGATGAA
181:  GGTTCCTGGA GATTGTTTCC ACCTGAAGAA CTTGTACAAT TTATGAAAAA AGCATCCCGT
241:  GACAAAAAGA AGATTGTTTA CATTGGATTT GGTTCTATTG TAGTGAAAAGA TGCAAAATCC
301:  TTAACGAAAG CTGTGGTGTG TGCTGTGAGA AGAGCCGACG TTCGTTGTAT TTTAAACAAG
361:  GGTGGTCTG ATCGATTGGA TAATAAAGAT AAAAATGAAA TTGAAAATTGA GTTGCCACCG
421:  GAAATTTACA ATTCTGGAAC TATACCTCAT GATTGGTTGT TTCCGCGTAT TGATGCTGCC
481:  GTGCACCATG CCGGCACCGG CACCAC
```

Fig. 14 : ApcrP

A.

1: G DVQPFVAIA KRLQDYGHRV RLATHANFKE FVLTAGLEFY PLGGDPKVLA GYMVKNGFL

61: P SGPSEIPIQ RNQMKDIIYS LLPACKEPDP DSGISFKADA IIANPPAYGH THVAEALKIP

121: I HVFFTMPWT P

B.

ApcrP : -----GDVQPFVAIAKRLQDYGHRVR

RaSGTp : LDVGGEDAYGDTVVEESLDGADIPSIPPQMIVILIVGTRGDVQPFVAIAKRLQDYGHRVR

ApcrP : LATHANFKEFVLTAGLEFYPLGGDPKVLAGYMVKNGFLPSGPSEIPIQRNQMKDIIYSL

RaSGTp : LATHANYKEFVLTAGLEFFFLGGDPKLLAKYMVKNGFLPSGPSEIPIQRKQKEIIFSL

ApcrP : LPACKEPDPSGISFKADAI IANPPAYGHTHVAEALKIPIHVFFTMPWT-----

RaSGTp : LPACKDPDPDTGIPFKVDAI IANPPAYGHTHVAEALKVPIHIFFTMPWTPTSEFPHPLSR

17/25

Fig. 15

A.

1: RGDVQPFTAI GKRLQDFGHR VRLATHANFK EFLSAGLEF YPLGGDPKIL AGYMVKNKGF  
 61: LPSGPSEIPV QRNMKEIY SLLPACKEPD MDTGVPEFKAD AIIANPPAYG HVHVAEALQI  
 121: PIHIFTMPW TPT

B

KcrP : -----RGDVQPFTAI GKRLQDFGHRV  
 HaSGTP : LDVGGEDAYGDVTVEESLDGADIPSI PPMQIVILIVGTRGDVQPFVAIAKRLQDYGHRV  
 : \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*  
 KcrP : LATHANFKEFLSAGLEFYPLGGDPKILAGYMVKNKGF LPSGPSEIPVQRNMKEIYSL  
 HaSGTP : LATHANYKEFLVTAGLEFFPLGGDPKLLAKYMVKNKGF LPSGPSEIPVQRNMKEIYSL  
 : \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*  
 KcrP : LPACKEPDMDTGVPEFKADAI IANPPAYGHVHVAEALQIPIHIFTMPWTPT-----  
 HaSGTP : LPACKDPDPDTGIPFKVDAI IANPPAYGHVHVAEALQIPIHIFTMPWTPTSEFPHPLSR  
 : \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*



19/25

Fig. 17.1

```

1:   ATTAATTCTC TCCTTCACTT TCTGGGATTG GAAACACGCA TACGCAAATT CGAGATACAC
61:   GAAGAAAGGA TCCAGATCGT TTTCTGCTGG TGGAGATAGA GAGAGAATCA CGATGCCGGA
121:  AATATCGCCG GCTGAGCTCG CCAAGGTTTC TTCCTCGTCT TCTTCTTCTT CTTCTCTAAG
181:  TTCCGGCAGA GCGTCGGTGA AAATCGAAGA GATTGAAGGC GGTGCTGCTG CTAGTGGCGT
241:  CGTCATTGTT TCTGAAGAAC TTGAGACCAA TCCCAAAACT GTTGTTCCTT CCATTGCTGA
301:  TGAAACTGTG GCTGAATCTT CAGGTACTGG CAATAAAAGC TTTTCTCGAG TATGGACAAT
361:  GCCATTGGAG GGTTCATCGA GCAGTGATAG GGCTGAATCA TCATCAACAA ACCAACCTAG
421:  GTTAGATAAA TCAAAGACTG AGAGGCAGCA AAAAGTTACT CACATTCTTG CTGAGGATGC
481:  TGCTAAGATT TTCGATGACA AAATCTCTGC AGGGAAGAAG CTTAAATTGC TGAACCGTAT
541:  AGCTACTGTG AAACATGATG GGACTGTTGA GTTTGAAGTT CCAGCAGATG CTATCCCTCA
601:  ACCTATTGTT GTTGATCGTG GAGAATCGAA AAACGGTGTT TGCGCTGATG AGTCTATTGA
661:  CGGGGTTGAC CTTCAGTATA TCCCTCCTAT GCAAATTGTG ATGTTAATTG TTGGAACACG
721:  TGGAGATGTT CAACCTTTTG TTGCAATAGC CAAACGGCTT CAGGACTATG GCCATCGAGT
781:  TAGACTTGCA ACTCATGCAA ATTTTAAAGA GTTTGTTTTG ACTGCTGGAT TAGAGTTTTA
841:  TCCTCTAGGT GGAGATCCAA AAGTGCTCGC CGGTTATATG GTTAAGAACA AGGGATTTTT
901:  GCCATCAGGC CCTTCAGAGA TTCCAATTCA ACGAAACCAA ATGAAGGACA TCATATATTC
961:  TCTACTTCCA GCATGTAAAG AACCTGATCC AGATTCTGGG ATTTCTTTTA AAGCTGATGC
1021: AATTATTGCC AACCTCCAG CGTATGGACA TACCCATGTG GCAGAAGCAC TGAAGATACC
1081: GATTACGTA TTTTTCACCA TGCCATGGAC ACCAACAAGT GAATTTCCAC ACCCATTGTC
1141: ACGTGTCAAA CAACCAGCAG GATACAGACT TTCATATCAA ATCGTCGATT CATTGATCTG
1201: GCTTGGAATA AGAGATATGG TAAATGACCT TAGGAAAAAG AAATTGAAAC TACGGCCTGT
1261: TACATATCTA AGTGAACAC AAGGATCTGG ATCTAATATC CCACATGGAT ATATGTGGAG
1321: TCCTCACCTT GTACCAAAGC CAAAAGACTG GGGGCCTCAA ATTGATGTAG TGGGATTTTG
1381: CTATCTTGAT CTTGCATCCA ACTATGAACC TCCTGCAGAG CTTGTGGAAT GGCTAGAAGC
1441: TGGTGACAAG CCCATATATA TCGGCTTTGG TAGTCTCCCT GTGCAAGAAC CAGAGAAAAT
1501: GACAGAAATC ATTGTGGAAG CACTTCAAAG AACTAAACAG AGAGGAATCA TCAACAAAGG
1561: TTGGGGTGGC CTTGGAAACT TGAAAGAACC GAAGGACTTT GTTTACTTGT TGGATAATGT
1621: CCCACATGAC TGGCTATTCC CGAGATGCAA AGCTGTGGTT CATCATGGTG GTGCTGGAAC
1681: AACGGCTGCG GGTCTTAAAG CCTCGTGCCC AACTACAATC GTGCCTTTCT TTGGAGACCA

```

Fig. 17.2

1741: ACCTTTTGG GGAGAACGAG TGCATGCTAG AGGTGTTGGT CCTTCACCAA TCCCAGTGGG  
1801: TGAATTCTCA CTTCATTAAGC TTGAAGATGC CATAAATTTT ATGCTCGACG ATAAGGTAAA  
1861: GAGCAGTGCA GAGACACTAG CAAAGGCGAT GAAGGACGAG GATGGTGTGG CTGGAGCCGT  
1921: GAAGGCCTTC TTAAACATC TTCCAAGTGC AAACAGAAAT ATCTCGGATC CGATCCCAGA  
1981: ACCTTCTGGA TTTCTCTCTT TCAGGAATG CTTTGGCTGT TCGTAACTTT CTTCTCTCCC  
2041: TCCAGAATCT CCTCTTTTCT CTTTGTATT GTTGTCTCTT GTAATGTTTT TCTTCTTCGG  
2101: TTTTGGCTAT ACAACAATTT GCTTAGGAAA AGTTTAAACA TTTGTGAAGT GCTTGGGAAA  
2161: TTTGCTGTTT TAGGGATGC ATATATTATA AAATTGTTAT AAGCAGCAAA AAAAAAAAAA  
2221: AAAAAAATT CTGAAGATGT GCAGATTAGT GAACATTGTT GTATCGAGTT TTAATATTAT  
2281: GACATATTTT GTTTCAGTTT CTTGAGCTGC AACTTCAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  
2341: AAAAAAAAAA AAA

21/25

Fig. 18

1: LILSFTFWS KHAYANSRYT KKGSRFSAG GDRERITMPE ISPAELAKVS SSSSSSSSSS  
61: SGRASVKIEE IEGGAAAGV VIVSEELTN PKTVVASIAD ETVAESSGTG NKSF SRVWTM  
121: PLEGSSSDR AESSSTNQPR LDKSKTERQQ KVTHILAEDA AKIFDDKISA GKKLKLLNRI  
181: ATVKHDGTVE FEVPADAIPQ PIVVDRGESK NGVCADESID GVDLQYIPPM QIVMLIVGTR  
241: GDVQPFVAIA KRLQDYGHRV RLATHANFKE FVLTAGLEFY PLGGDPKVLA GYMVKNGGFL  
301: PSGPSEIPIQ RNQMKDIIYS LLPACKEPDP DSGISFKADA IIANPPAYGH THVAEALKIP  
361: IHVFFTMPWT PTSEFPHPLS RVKQPAGYRL SYQIVDSLW LGIRDMVNDL RKKKLKLRPV  
421: TYLSGTQSG SNIPHYMWS PHLVPKPKDW GPQIDVVGFC YLDLASNYEP PAELVEWLEA  
481: GDKPIYIGFG SLPVQEPEKM TEIIVEALQR TKQGIINKG WGGLGNLKEP KDFVYLLDNV  
541: PHDWLFPRCK AVVHHGGAGT TAAGLKASCP TTIVPFFGDQ PFWGERVHAR GVGPSPIPVD  
601: EFSLHKLEDA INFMLDDKVK SSAETLAKAM KDEDGVAGAV KAFFKHLPSA KQNISDPIPE  
661: PSGLSFRKC FGCS



22/25

Fig. 19

```
AtSGTP : LILSFTFWDKSHAYANSRYTKKGSRFSAGGDRERITMPEISPAELAKVSSSSSSSSSSSS
HaSGTP : -----RILRLLIPLHVGSRFPPPRRNSRRSRRRS
          * . * . * * *

AtSGTP : SGRASVKIEEIEGGAAASGVVIVSEEL-----ETNPKTVVASIADETVAE-
HaSGTP : NRRAKSGISGPTGTAGAVQMADA EPTGVGGKAEDIGGAEAHSRDSPASAALPTAPST
          **      *      *      *      *      *      *      *      *

AtSGTP : -SSGTGNKSFSRVWMTLEGSSSDRAESSSTNQPRLDKSKTERQQKVTHILAEDAAKIF
HaSGTP : SSSADNGNLHRSSTMP--GVIKDAEIITETTGPSNFERSKTERR---RQNNDPAKQLL
          **      *      *      ***      *      *      *      *      *

AtSGTP : DDKISAGKKLKLLNRIATVKHDGTVEFEVPADAIPQPIVVDRGESKNGVCADESIDGVDL
HaSGTP : DDKISVRKKLKMLNRIATVRDDGTVVVDVPSSLDLAPLDVGGEDAYGDVTVEESLDGADI
          *****      ****      *****      ****      **      *      *      *      *      *

AtSGTP : QYIIPMQIVMLIVGTRGDVQPFAIAKRLQDYGHRVRLATHANFKEFVLTAGLEFYPLGG
HaSGTP : PSIIPMQIVILIVGTRGDVQPFAIAKRLQDYGHRVRLATHANYKEFVLTAGLEFFPLGG
          *****      *****      *****      *****      *****      *****      *****

AtSGTP : DPKVLAGYMVNKNKGFLPSGPSEIPIQRNQMKDIIYSLLPACKEPDPDSGISFKADAI IAN
HaSGTP : DPKL LAKYMVNKNKGFLPSGPSEIPIQRKQMEI IFSLLPACKDPDPDTGI PFKVD AI IAN
          ***      **      *****      *****      ***      *      *****      *****      *      *      *****

AtSGTP : PPAYGHTHVAEALKIPIHVFFTMPWTPTSEFPHLSRVKQPAGYRLSYQIVDSLWLIR
HaSGTP : PPAYGHTHVAEALKVIPIHFFTMPWTPTSEFPHLSRVKTSAGYRLSYQIVDSMIWLIR
          *****      *****      *****      *****      *****      *****      *****

AtSGTP : DMVNDLRKKKKLKPVTYLSGTQGSGSNIPHGYMWSPHLVPKPKDWGPQIDVVGFCYLDL
HaSGTP : DMINEFRKKKKLKPVTYLSGSQSGSGSDIPHGYIWSPHLVPKPKDWGPKIDVVGFCFLDL
          * . * . *****      *****      *****      *****      *****      *****

AtSGTP : ASNYEPPAELVEWLEAGDKPIYIGFGSLPVQEPEKMTEIIVEALQRTKQIRGIINKGWGGL
HaSGTP : ASDYEPPPEELVKWLEAGDKPIYVGFGLSPVDPTKMTETIIQALEM TGQRGIINKGWGGL
          **      *****      *****      *****      *      *****      *      *      *****

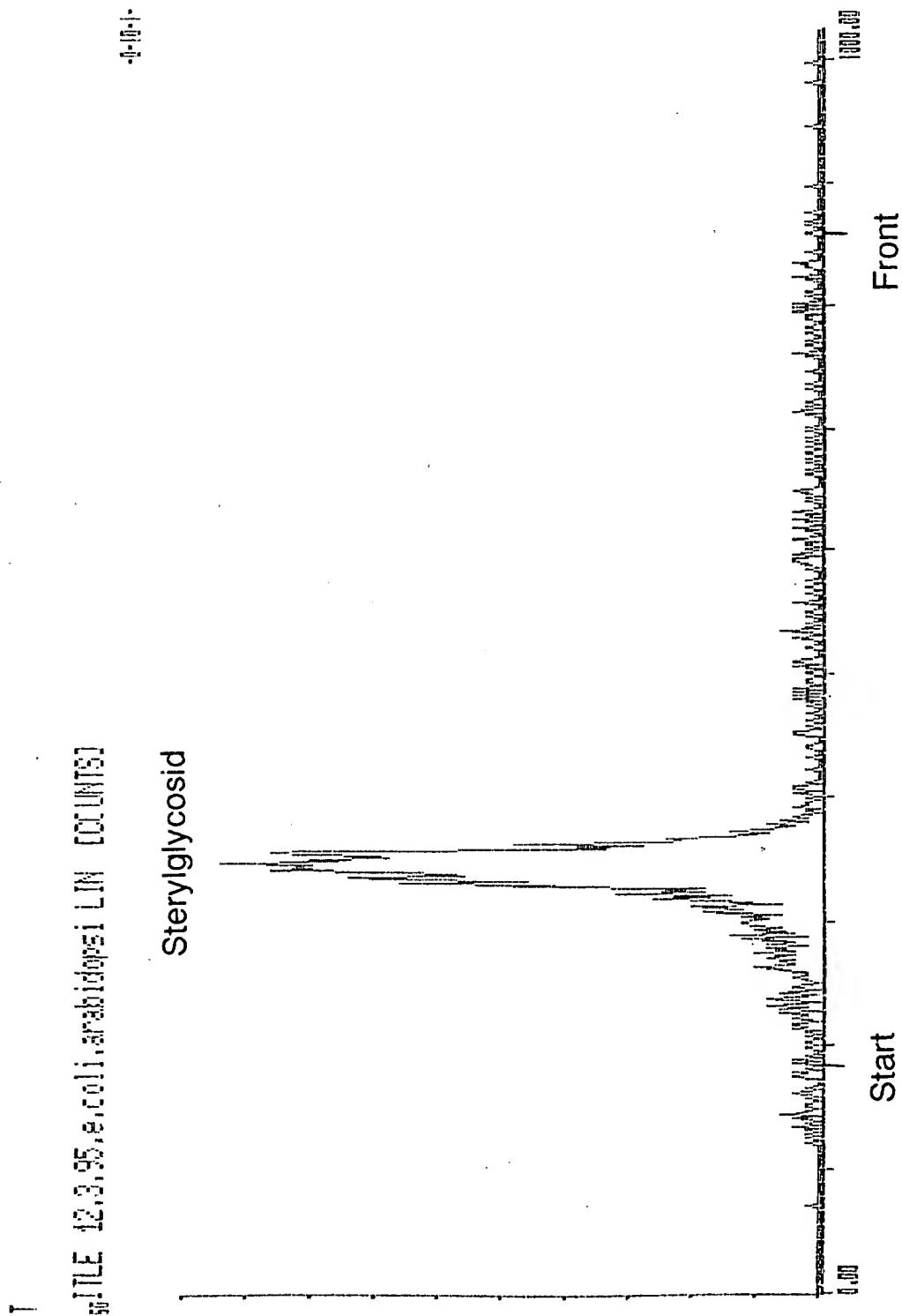
AtSGTP : GNLKEPKDFVYLLDNVPHDWLFPRCKAVVHHGGAGTTAAGLKASCPTTI VPFPGDQPFWG
HaSGTP : GTLAEPKDSIYVLDNC PHDWLFLOCKAVVHHGGAGTTAAGLKAACPTTI VPFPGDQQFWG
          *      *****      *      *      *****      *****      *****      *****      *****

AtSGTP : ERVHARGVGPSP IPVDEFSLHKLED AINFMLDDKV KSSAETLAKAMKDEDGVAGAVKAFF
HaSGTP : DRVHARGVGPVPIPVEQFNLOQLVDAMKFMLEPEVKEKPELAKPMESEDGVTGAVRAFL
          *****      *****      *      *      *      *      *      *      *      *      *****

AtSGTP : KHLPSAQNISDPIPEPSGFLSFR----KCFGCS
HaSGTP : KHL PSSKEDENSPPTPHGFLEFLGVPVSKLCGS
          *****      *      *      *      *      *      *      *
```

23/25

Fig. 20



24/25

Fig. 21

1: IPPMQIVILI VGTRGDVQPF VAIKRLQDY GHRVRLATHA NYKEFVLTAG LEFFPLGGDP  
61: KLLAKYMWKN KGFLPSGPSE IPIQRKQMK E IIFSLLPACK DPDPDTGIPF KVDAILIANPP  
121: AYGHTHVAEA LKVPIHIFT MPWTPTSEFP HPLSRVKTSA GYRLSYQIVD SMWLGIRDM  
181: INEFRKKKLLK LRPVTYLSGS QGSGSDIPHG YIWSPHLVPK PKDWGPKIDV VGFCFLDLAS  
241: DYEPPEELVK WLEAGDKPIY VGFGSLPVQD PTKMTETIIQ ALEMTGQGI INKGWGGLGT  
301: LAEPKDSIYV LDNCPHDWLF LQCKAVVHHG GAGTTAAGLK AACPTTIVPF FGDQQQFWGDR  
361: VHARGVGVPV IPVEQFNLOK LVDAMKFMLE PEVKEKPVLE AKPMESEDTV TGAVRAFLKH  
421: LPSSKEDENS PPPTPHGFLE FLGPVSKCLG CS

25/25

Fig. 22

1: IPPMQIVMLI VGTRGDVQPF VAIARLQDY GHRVRLATHA NFEFVLTAG LEFYPLGGDP  
 61: KVLAGYMKVKN KGFLPSGPSE IPIQRNQMKD IIYSLLPACK EPDPDSGISF KADAIIANPP  
 121: AYGHTHVAEA LKIPIHVFFT MPWTPTSEFP HPLSRVKQPA GYRLSYQIVD SLIWLGIRDM  
 181: VNDLRKKKLLK LRPVTYLSGT QSGSNIPHG YMWSPHLVPK PKDWGPQIDV VGFCYLDLAS  
 241: NYEPPAELVE WLEAGDKPIY IGFGSLPVQE PEKMTIIVE ALQRTKQGI INKGWGGLGN  
 301: LKEPKDFVYL LDNVPHDWLF PRCKAVVHHG GAGTTAAGLK ASCPTTIVPF FGDQPFWGER  
 361: VHARGVGPSP IPVDEFSLHK LEDAINFMLD DKVKSSAETL AKAMKDEDGV AGAVKAFFKH  
 421: LPSAKQNISD PIPEPSGFSL FRKCFGCS

Fig. 23

1: ENPHYKTSIK PNKSYKFGLL TIGSRGDVQP YIALGKGLIK EGHQVVIITH SEFRDFVESH  
 61: GIQFEEIAGN PVELMSLMVE NESMNVKMLR EASSKFRGWI DALLQTSWEV CNRRKFDILI  
 121: ESPSAMVGIH ITEALQIPYF RAFTMPWTRT RAYPHAFIVP DQKRGGNVNY LTHVLFENVF  
 181: WKGISGQVKN WRVETLGLGK TNLFLLQNN VPFLYNVSPT IFPPSIDFSE WVRVTGYWFL  
 241: DDKSTFKPPA ELQEFISEAR SKGKKLVYIG FGSIVVSNK EMTEALVEAV MEADVYCILN  
 301: KGWSERLGDK AAKKTEVDLP RNILNIGNVP HDWLFPPQVDA AVHHGSGTT GASLRAGLPT  
 361: VIKPFFGDQF FYAGRVEDIG VGIALKKLNA QTLADALKVA TTNKIMKDRA GLIKKKISKE  
 421: DGIKTAISAI YNELEYARSV TLSRVKTPRK KEENVDATKL TPAETTDEGW TMI

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/DE 97/02335

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N9/10 C12N15/62 C12N15/63 C12N15/82 C12P33/00  
C12Q1/68 C07K16/40 A01H5/00 //(C12N15/63,C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12Q C07K C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,0	WARNECKE D. ET AL.: "Cloning of an oat cDNA clone coding for the UDP-glucose:sterol glucosyltransferase and functional expression in E. coli" BIOL. CHEM. HOPPE-SEYLER, vol. 376, no. suppl., 1995, page S60 XP002055890 see abstract	1-12, 14-21, 25-37
A	---	22-24
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 February 1998

Date of mailing of the international search report

10/03/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Galli, I

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 97/02335

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WARNECKE D.C. & HEINZ E.: "Purification of a membrane-bound UDP-Glucose:sterol beta-D-glucosyltransferase based on its solubility in diethylether" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 105, 1994, pages 1067-1073, XP002055891 cited in the application see abstract see figure 2	1-11, 17-21, 35-37
A	---	12-16, 22-34
A	WOJCIECHOWSKI Z.A. ET AL.: "Specificity of sterol-glucosylating enzymes from <i>Sinapis alba</i> and <i>Physarum polycephalum</i> " BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 570, 1979, pages 363-370, XP002055893 see page 363 - page 364	1-21, 25-37
A	---	1-21, 25-37
A	LENART U. ET AL.: "Evidence for the involvement of a 66 kDa membrane protein in the synthesis of sterolglucoside in <i>S. cerevisiae</i> " ACTA BIOCHIMICA POLONICA, vol. 42, no. 2, 1995, pages 269-274, XP002056288 see abstract	1-21, 25-37
A	---	22-24
A	UEMURA M. & STEPONKUS P.L.: "A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance" PLANT PHYSIOL., vol. 104, 1994, pages 479-496, XP002055892 see abstract	22-24
P,X	---	1-37
P,X	WARNECKE D.C. ET AL.: "UDP-glucose:sterol glucosyltransferase: cloning and functional expression in <i>E. coli</i> " PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 35, no. 5, 1997, pages 597-603, XP002055894 see abstract	1-37
	-----	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC 1/DE 97/02335

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N9/10 C12N15/62 C12N15/63 C12N15/82 C12P33/00  
C12Q1/68 C07K16/40 A01H5/00 //(C12N15/63,C12R1:19)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12Q C07K C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X,0	WARNECKE D. ET AL.: "Cloning of an oat cDNA clone coding for the UDP-glucose:sterol glucosyltransferase and functional expression in E. coli" BIOL. CHEM. HOPPE-SEYLER, Bd. 376, Nr. suppl., 1995, Seite S60 XP002055890 siehe Zusammenfassung	1-12, 14-21, 25-37
A	---	22-24
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

8

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Februar 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

10/03/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Galli, I

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	WARNECKE D.C. & HEINZ E.: "Purification of a membrane-bound UDP-Glucose:sterol beta-D-glucosyltransferase based on its solubility in diethylether" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 105, 1994, Seiten 1067-1073, XP002055891 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung siehe Abbildung 2	1-11, 17-21, 35-37
A	---	12-16, 22-34
A	WOJCIECHOWSKI Z.A. ET AL.: "Specificity of sterol-glucosylating enzymes from Sinapis alba and Physarum polycephalum" BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, Bd. 570, 1979, Seiten 363-370, XP002055893 siehe Seite 363 - Seite 364	1-21, 25-37
A	---	
A	LENART U. ET AL.: "Evidence for the involvement of a 66 kDa membrane protein in the synthesis of sterolglucoside in S. cerevisiae" ACTA BIOCHIMICA POLONICA, Bd. 42, Nr. 2, 1995, Seiten 269-274, XP002056288 siehe Zusammenfassung	1-21, 25-37
A	---	
A	UEMURA M. & STEPONKUS P.L.: "A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance" PLANT PHYSIOL., Bd. 104, 1994, Seiten 479-496, XP002055892 siehe Zusammenfassung	22-24
P,X	---	
P,X	WARNECKE D.C. ET AL.: "UDP-glucose:sterol glucosyltransferase: cloning and functional expression in E. coli" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 35, Nr. 5, 1997, Seiten 597-603, XP002055894 siehe Zusammenfassung	1-37
	-----	